



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-memoires-contact@univ-lorraine.fr

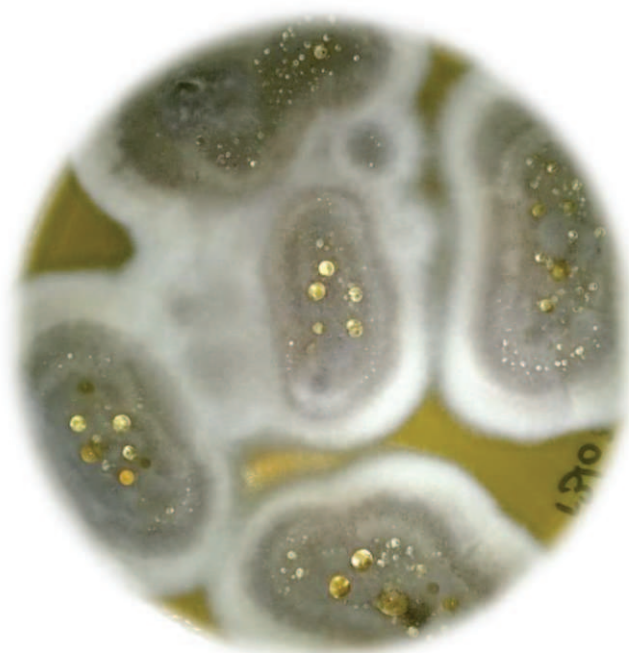
LIENS

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>



*Antagonisme entre les espèces du complexe *Scedosporium apiospermum* et *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose : caractérisation des molécules inhibitrices*

Cindy STAERCK

Laboratoires :

- a. Groupe d'Etudes des Interactions Hôtes Pathogènes (GEIHP, UPRES EA 3142, SFR I CAT 4208), Institut de Biologie en Santé PBH-IRIS, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France
- b. Substances d'origine naturelle et analogues structuraux (SONAS, UPRES EA 921, SFR QUASAV 4207) UFR des Sciences Pharmaceutiques et Ingénierie de la Santé, Université d'Angers, 16 Bd Daviers, 49045 Angers, France.

Sous la direction de :

Dr Maxime FLEURY (a), Dr Anne LANDREAU (b)



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Pr Jean-Philippe BOUCHARA pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon stage de deuxième année de master au sein de son équipe de recherche : Le groupe d'étude des interactions hôtes-pathogènes. Je vous remercie aussi pour la participation au troisième meeting de l'ECMM/ISHAM working group ayant eu lieu à Angers le 5 et 6 juin 2014.

Je remercie M. Maxime FLEURY, membre du laboratoire GEIHP, de m'avoir encadré tout au long de ces six mois de stage. Merci pour les nombreux conseils concernant la réalisation des expériences, la rédaction, ainsi que pour les présentations orales. Merci pour ta/votre disponibilité et ta/votre sympathie. Et merci d'assister à ma soutenance à Nancy.

Je remercie Mme Anne LANDREAU, membre laboratoire SONAS du de m'avoir co-encadré sur la partie purification et caractérisation. Merci pour votre disponibilité, votre aide et vos explications des différentes techniques d'analyses physicochimiques réalisées tout au long de ce stage. Merci aussi pour les nombreux conseils concernant la rédaction de ce mémoire. Je vous remercie aussi pour votre sympathie.

Je remercie Gaëlle, pour m'avoir épaulée lors de la réalisation des nombreux antibiogrammes, de la préparation des milieux de culture, des filtrations...

Je remercie l'ensemble de l'équipe pour leur sympathie, leur convivialité, leur intégration et les conseils qu'ils ont pu me dispenser tout au long de ce stage. Merci à Abdel, Amandine, Charlotte, Gaëlle, Julia, Maxime, Patrick, Sandrine, Sara M, Sarah G.

*Je remercie Pr M-J JOLY-GUILOUX, et Dr EVEILLARD, pour nous avoir fourni les souches de *Staphylococcus* résistantes aux antibiotiques.*

Je remercie Mme Caroline SERVANT, de Végépolis, pour sa sympathie, la réalisation des analyses par HPLC-ELSD, ainsi que pour l'évaporation des plaques issues du micro fractionnement.

Je remercie Mme Ingrid FREUZE et M Benjamin SIEGLER de la plateforme PIAM pour la réalisation des analyses par spectrométrie de masse et par RMN.

Je remercie Dr David GUILLET, pour la réalisation des analyses par UPLC-MS.

Je remercie également Dimitri du SONAS pour ses conseils et son aide pour la partie purification et caractérisation des molécules.

Je remercie l'association vaincre la mucoviscidose pour le financement cette étude et l'invitation au 20^{ème} Colloques des jeunes chercheurs à Paris, le 18 Février 2014.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des équipes pédagogiques du master BioMANE.

Sommaire

Abréviations.....	
Listes des figures	
Liste des tableaux.....	
Liste des microorganismes utilisés	
Introduction.....	
I. Introduction générale.....	1
II. La mucoviscidose.....	1
A. Historique.....	1
B. La protéine CFTR.....	2
C. Physiopathologie de la mucoviscidose	2
D. Les infections chez les patients atteints de la mucoviscidose.....	2
III. Le complexe <i>Scedosporium</i>	5
A. Historique.....	5
B. Identification.....	5
C. Taxonomie	6
D. Environnement.....	7
E. Épidémiologie.....	8
F. Métabolites produits par les souches du complexe <i>Scedosporium</i>	9
IV. De la découverte des antimicrobiens à l'émergence de souches multirésistantes aux antimicrobiens.	11
Matériels et méthodes	11
I. Matériels biologiques	11
A. Souches fongiques utilisées et cultures.....	11
B. Souches bactériennes utilisées et cultures.....	12
II. Inhibition de cultures, antibiogrammes et antifongigrammes	123
A. Mise au point des <i>inoculum</i>	123
B. Inhibition de la croissance fongique	14

C. Inhibition de la croissance bactérienne	14
III. Purification et caractérisation des métabolites antibactériens sécrétés dans le surnageant de culture par <i>Pseudallescheria boydii</i> 4595.....	11
A. Extraction des métabolites fongiques.	15
B. Séparation et purification des molécules à activités antibactériennes.	16
C. Analyse des fractions à activité antibactérienne	18
Résultats.....	
I. Résultats préliminaires	20
II. Mise au point des techniques de réalisation des antifongigrammes et antibiogrammes.....	20
A. Mise au point de l'antifongigramme	20
B. Mise au point de l'antibiogramme	20
III. Inhibition de croissance entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Pseudallescheria boydii</i>	21
IV. Mise en évidence de l'activité du surnageant de culture de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur la croissance fongique	21
A. Surnageants de culture de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lyophilisés	21
B. Surnageants de culture de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> non lyophilisé.....	21
V. Inhibition de la croissance bactérienne par le surnageant de culture de <i>P. boydii</i> 4595.....	22
A. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des surnageants	22
B. Mise en évidence de l'activité des surnageants de <i>P. boydii</i> 4595 sur la croissance de souches de <i>Staphylococcus</i> résistantes aux antibiotiques.	23
C. Détermination de l'impact de la température sur la synthèse de métabolites à activité antibactérienne.	23
VI. Purification et caractérisation des métabolites antibactériens sécrétés dans le surnageant de culture de <i>P.boydii</i> 4595.....	24
A. Résultats des extractions	24
B. Identification des extraits présentant une activité antibactérienne.....	25
C. Purification des métabolites à activité antibactérienne de l'extrait cyclohexane.....	26
D. Purification des métabolites à activité antibactérienne de l'extrait Acétate d'éthyle	27

Discussion et perspectives.....	
I. Premier axe de recherche : la validation de l'antagonisme entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et les espèces du complexe <i>Scedosporium</i>	28
II. Deuxième axe d'étude : Mise en évidence de l'inhibition de la croissance bactérienne par le surnageant de culture de <i>P. boydii</i> 4595 et étude du spectre d'activité	29
III. Troisième axe : Purification et caractérisation de la ou des molécules à activité antibactérienne.....	30
Bibliographie	
Annexes.....	

Abréviations

- ACN : Acétonitrile
- AcOEt : Acétate d'éthyle
- AF : Acide formique
- AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
- BuOH : Butanol
- C₆H₁₂ : Cyclohexane
- CBS : Centraalbureau voor Schimmelcultures
- CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
- CHU : Centre Hospitalier Universitaire
- CIP : Collection Institut Pasteur
- DAPG : 2,4-DiAcetylPhloroglucinol
- DCM : Dichlorométhane
- DMSO : DiMéthyl SulfOxyde
- ELSD : Détecteur à diffusion de lumière
- GEIHP : Groupe d'Etude des Interactions Hôtes Pathogènes
- HPLC : High-Performance Liquid Chromatography
- IHEM : Institut of Hygiène and Epidemiology Mycology
- ITS : Internal Transcribed Spacer
- LB : Lysogeny Broth
- LBA : Lysogeny Broth Agar
- LMA : Laboratoire de Mycologie du CHU d'Angers
- MF : Mac Farland
- MS : Spectrométrie de masse
- PDA : Détecteur à barrette de diodes
- RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
- RPM : Rotation Par Minute
- SONAS : Substance d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux
- TSS III : Système de sécrétion de type III
- TUB : β -tubuline
- UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatographie
- UV : Ultra violet
- WT : Wild Type
- YPD : Yeast Peptone Dextrose
- YPDA : Yeast Peptone Dextrose Agar

Listes des figures

Figure 1: A gauche, co-culture entre <i>P. boydii</i> (ensemencé en nappe) et de <i>P. aeruginosa</i> (déposé au centre de la boîte de culture). A droite culture de <i>P. aeruginosa</i> avec au centre un disque de papier buvard imprégné d'un surnageant de culture de <i>P. boydii</i>	2
Figure 2: Organes touchés par la mucoviscidose.	5
Figure 3: Colonisation/infection retrouvé en 2012 chez les patients souffrant de la mucoviscidose, lien entre agents infectieux et âge des patients(2)	6
Figure 4: <i>Scedosporium apiospermum</i> sur milieu solide (YPDA).	9
Figure 5: Aspect microscopique des conidies de <i>Scedosporium apiospermum</i> .	9
Figure 6: Un des Arbres phylogénétique du complexe <i>Scedosporium</i> , réalisé à partir des gènes TUB (Félix Gilgado et al. 2006)	8
Figure 7: Organes et tissus infectés par des souches du complexe <i>Scedosporium</i> (27).	8
Figure 8: Illustration de la récupération des surnageants en utilisant une unité de filtration.	12
Figure 9: Lyophilisateur alpha 1-4 LS.	12
Figure 10: Extraction du surnageant de culture de <i>Pseudallescheria boydii</i> par le solvant butanol.	14
Figure 11: Gradient d'élution de l'extrait cyclohexane.	12
Figure 12: Gradient d'élution des extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle pour l'HPLC-ELSD.	12
Figure 13: Illustration de la co-culture entre <i>P. aeruginosa</i> et <i>P. boydii</i> 4595.	21
Figure 14: Inhibition de la croissance bactérienne par le surnageant de culture de <i>P. boydii</i> 4595 (surnageant 4). De gauche à droite, inhibition de la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> , de <i>Staphylococcus epidermidis</i> , et de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	22
Figure 15: Inhibition de la croissance de souches de <i>Staphylococcus aureus</i> par le surnageant n°3. De gauche à droite, souche 140 019 0822 060(3), souche 145 008 821 01, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	23
Figure 16 : Profil HPLC à 254nm ayant servi à l'établissement des fractions. Concentration de l'extrait à 45mg/mL	25
Figure 17: Profil HPLC de l'extrait dichlorométhane sur lequel l'HPLC préparative a été réalisé, au-dessus le profil à 254nm, en dessous le profil à 360nm.	25
Figure 18: Profil HPLC à 360nm de l'extrait cyclohexane, au dessus le profil complet, en dessous un agrandissement a été réalisé sur le pic.	25
Figure 19: Chromatogramme des pics obtenus à 360nm, à droite celui correspondant au temps de rétention de 18.721min et à gauche celui correspondant au temps de rétention de 18.866min.	26
Figure 20: Résultats de la spectrométrie de masse sur l'extrait cyclohexane total, en haut le profil de séparation par chromatographie liquide à 360nm en vert couplé au profil de la masse en noir. En bas le spectre masse obtenu pour le maximum d'intensité. (en mode négatif)	26
Figure 21: Profil HPLC de l'extrait acétate d'éthyle sur lequel l'HPLC préparative a été réalisé, au dessus le profil à 254 nm, en dessous le profil à 360 nm.	27

Liste des tableaux

Tableau I: Classes des mutations provoquant la mucoviscidose (Boyle and De Boeck 2013).	4
Tableau II: Récapitulatif des molécules synthétisées par les souches du complexe <i>Scedosporium</i>	8
Tableau III: Présentation des souches fongiques utilisées.	12
Tableau IV: Présentation des souches bactériennes utilisées.	12
Tableau V: Culture de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	12
Tableau VI: Paramètres des solvants d'extraction.	12
Tableau VII: Gradient d'élution utilisé lors de l'HPLC analytique sur l'extrait dichlorométhane et acétate d'éthyle.	12
Tableau VIII: Gradient d'élution utilisé lors de l'HPLC analytique sur l'extrait cyclohexane	12
Tableau IX: Gradient d'élution utilisé lors de l'HPLC-ELSD sur les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle.	12
Tableau X : Gradient d'élution utilisé pour tous les échantillons en UPLC-MS.	12
Tableau XI: Paramètres d'UPLC-MS.	12
Tableau XII: Mise au point de l'inoculum adéquat pour la réalisation des antifongigrammes.	16
Tableau XIII: Résultats des antibiogrammes réalisés à partir des surnageants de culture <i>P. boydii</i> 4595 (n= nombre de réplication).	20
Tableau XIV : Résultats des antibiogrammes réalisés sur <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> et des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> présentant des résistances aux antibiotiques. (n : nombre de réplication par surnageant)	22
Tableau XV: Résultats des antibiogrammes réalisés à partir des surnageants issues des incubations à différentes températures. (n : nombre de réplifications).	24
Tableau XVI: Résultats des masses obtenues pour chaque extrait.	24
Tableau XVII: Résultats des tests d'inhibitions avec les extraits résultants de l'extraction liquide/liquide des surnageants de culture de <i>P.boydii</i> 4595 (surnageant 4) ND : Non déterminée en raison d'un problèmes techniques .	24
Tableau XVIII: Réalisation des fractions sur l'extrait dichlorométhane et identification des fractions douées d'une activité antibactérienne, NT : non testé	25
Tableau XIX: Fractions récupérées lors de l'HPLC préparative de l'extrait dichlorométhane	25
Tableau XX: Résultats de l'infusion en spectrométrie de masse de la fraction H6 de l'extrait dichlorométhane	25
Tableau XXI: Résultats des infusions en spectrométrie de masses de la fraction A6 de l'extrait dichlorométhane.	25
Tableau XXII: Résultats des spectromètres de masse de la perfusion de la fraction cyclohexane isolé.	26
Tableau XXIII: Fractions récupérées issu de l'HPLC préparative.	27

Liste des microorganismes utilisés

– Souches bactériennes

- *B. cereus* : *Bacillus cereus*
- *E. coli* : *Escherichia coli*
- *E. faecalis* : *Enterococcus faecalis*
- *K. pneumoniae* : *Klebsiella pneumoniae*
- *P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*
- *S. marcesens* : *Serratia marcesens*
- *S. aureus* : *Staphylococcus aureus*
- *S. epidermidis* : *Staphylococcus epidermidis*
- *S. agalactiae* : *Streptococcus agalactiae*
- *S. pyogenes* : *Streptococcus pyogenes*

– Souches fongiques

- *A. fumigatus* : *Aspergillus fumigatus*
- *A. terreus* : *Aspergillus terreus*
- *E. epidermitidis* : *Exophiala epidermitidis*
- *P. boydii* : *Pseudallescheria boydii*
- *P. ellipsodea* : *Pseudallescheria ellipsodea*
- *P. minuspora* : *Pseudallescheria minuspora*
- *R. argillacea* : *Rasamsonia argillacea*
- *S. apiospermum* : *Scedosporium apiospermum*
- *S. auranticaum* : *Scedosporium aurantiacum*
- *S. dehoogii* : *Scedosporium dehoogii*
- *S. prolificans* : *Scedosporium prolificans*

Introduction

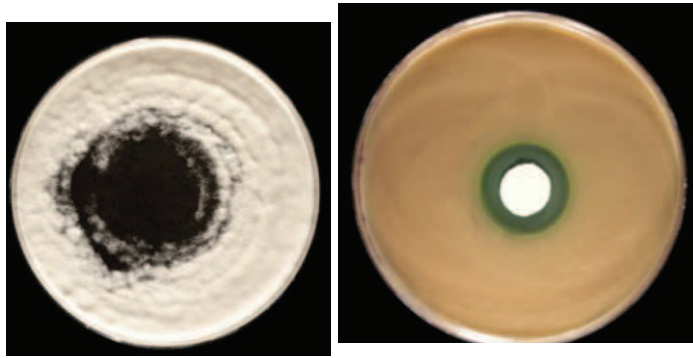


Figure 1: A gauche, co-culture entre *P. boydii* (ensemencé en nappe) et de *P. aeruginosa* (déposé au centre de la boîte de culture). A droite culture de *P. aeruginosa* avec au centre un disque de papier buvard imprégné d'un surnageant de culture de *P. boydii*

I. Introduction générale

L'analyse des résultats des examens bactériologiques et mycologiques des expectorations, des patients atteints de mucoviscidose, réalisés par les laboratoires de Bactériologie-Hygiène Hospitalière et de Parasitologie-Mycologie du CHU d'Angers, sur une durée de 3 ans, montre un antagonisme entre *Pseudomonas aeruginosa* et les espèces du complexe *Scedosporium apiospermum*.

Peu d'études ont été réalisées sur ce potentiel antagonisme, seule une publication évoque cette observation (Blyth *et al.* 2010). Selon l'étude de Christopher Blyth parue en 2010, il a été mis en évidence que les patients atteints de la mucoviscidose colonisés par *S. apiospermum* étaient moins sujet à des colonisations/infections à *P. aeruginosa* que les autres patients, et inversement. Ce qui suggère l'existence d'un antagoniste entre *S. apiospermum* et *P. aeruginosa*.

Des expériences préliminaires, réalisées au laboratoire, ont montré la présence d'une activité antibactérienne *in vitro* dans le surnageant de culture du *S. apiospermum* vis-à-vis d'une souche sauvage de *P. aeruginosa*, et la présence d'une activité antifongique de la même souche de *P. aeruginosa* vis-à-vis de *S. apiospermum* (Figure 1, p 1b).

Ainsi le but de ce stage était, d'une part de reproduire l'antagonisme précédemment observé. Et d'autre part d'en étudier le spectre d'activité des inhibitions ainsi que de purifier et de caractériser les métabolites à activité antimicrobienne produits par la bactérie et par le champignon.

II. La mucoviscidose.

A. Historique

La mucoviscidose est la maladie héréditaire, à transmission autosomique récessive, la plus fréquemment rencontrée dans la population caucasienne, son incidence est d'une naissance sur 3 500 (Registre Français de la mucoviscidose)(Cimon *et al.* 2007; Palma *et al.* 2014). Une personne sur 25 est hétérozygote pour une des mutations provoquant la mucoviscidose. Cette fréquence peut paraître élevée, mais cela peut s'expliquer par la faculté de résistance à certaines maladies infectieuses comme le Choléra, que pourrait apporter cette mutation, comme c'est le cas entre la drépanocytose et le paludisme (Rougeron 2013). Cette incidence varie selon les groupes ethniques, en effet chez les personnes d'origine afro-américaine l'incidence n'est que d'une naissance sur 15 000, ou encore d'une naissance sur 31 000 au sein de la population américano-asiatique (Boyle et De Boeck 2013; Ratjen et Döring 2003; Strausbaugh et Davis 2007)

Cette pathologie est connue depuis le Moyen-âge. Déjà à cette époque un lien avait été établi entre la sueur riche en chlorure et la maladie, puisqu'un vieil adage de l'Europe du Nord déclare : « *Malheur à l'enfant chez qui un baiser sur le front a un goût salé. Il est ensorcelé et doit bientôt mourir* » (Strausbaugh et Davis 2007). Cependant, c'est seulement en 1936 que la maladie est décrite scientifiquement par le pédiatre Fanconi, puis par la pathologiste Dorothy Andersen, en 1938, qui

Tableau I: Classes des mutations provoquant la mucoviscidose (Boyle et De Boeck 2013).

Normal	I	II	III	IV	V	VI
Mature functional CFTR Nascent CFTR Endoplasmic reticulum Full-length CFTR RNA Nucleus CFTR DNA	Absent functional CFTR Absent nascent CFTR Endoplasmic reticulum Unstable truncated RNA Nucleus CFTR DNA	Absent functional CFTR Protease destruction of misfolded CFTR Endoplasmic reticulum Full-length CFTR RNA Nucleus CFTR DNA	Defective channel regulation Nascent CFTR Endoplasmic reticulum Full-length CFTR RNA Nucleus CFTR DNA	Defective CFTR channel Nascent CFTR Endoplasmic reticulum Full-length CFTR RNA Nucleus CFTR DNA	Scarce functional CFTR Scarce nascent CFTR Endoplasmic reticulum Correct RNA - Incorrect RNA Nucleus CFTR DNA	Decreased CFTR membrane stability Nascent CFTR Endoplasmic reticulum Full-length CFTR RNA Nucleus CFTR DNA
CFTR defect	No functional CFTR protein	CFTR trafficking defect	Defective channel regulation	Decreased channel conductance	Reduced synthesis of CFTR	Decreased CFTR stability
Type of mutations	Nonsense; frameshift; canonical splice	Missense; aminoacid deletion	Missense; aminoacid change	Missense; aminoacid change	Splicing defect; missense	Missense; aminoacid change
Specific mutation examples ¹¹	Gly542X Trp1282X Arg553K 621+1G→T	Phe508del Asn1303Lys Ile507del Arg560Thr	Gly551Asp Gly178Arg Gly551Ser Ser549Asn	Arg117His Arg347Pro Arg117Cys Arg334Trp	3849+10kbC→T 2789+5G→A 3120+1G→A 5T	4326delTC Gln1412X 4279insA

entre la maladie et la richesse de la sueur en ions chlorure est établi, mais c'est seulement en 1983, que le défaut de la régulation du transport en ions chlorure sera identifié (Strausbaugh et Davis 2007). Le chromosome 7 est identifié en 1985 comme porteur du gène, mais c'est en 1989 que le gène est identifié, porté par la bande q31, d'une taille de 250kb et composé de 27 exons. Il code pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) composée de 1480 acides aminés qui est un transporteur d'ion chlorure (Palma *et al.* 2014; Strausbaugh et Davis 2007; Rommens 1989). Depuis que le gène a été reconnu 1970 mutations, engendrant la mucoviscidose, ont été identifiées. Cependant en routine, une trentaine de mutations sont recherchées et représentent 85 à 90% des allèles mutés chez les malades (Registre Français de la mucoviscidose 2014; Strausbaugh et Davis 2007; "Cystic Fibrosis Mutation Database: Statistics" 2014).

Les mutations responsables de la mucoviscidose peuvent être classées en 6 classes (Boyle et De Boeck 2013; Ratjen et Döring 2003)(Tableau 1, p 2 bis). La mutation la plus couramment retrouvée en France, avec une prévalence de 42,3%, appartient à la deuxième classe. Il s'agit d'une délétion de la phénylalanine en position 508 sur la protéine CFTR (F508del) (Registre Français de la mucoviscidose 2014; Ratjen et Döring 2003; Rommens 1989). Les mutations de type deux, engendrent un défaut de transfert des canaux vers les membranes des cellules épithéliales.

B. La protéine CFTR

La protéine transmembranaire CFTR appartient à la famille des transporteur ABC, et est activée *via* l'AMPc grâce à l'activation d'un récepteur β_2 adrénergique et d'une séquence codante polymorphe (Ratjen et Döring 2003; Cant *et al.* 2014). La protéine CFTR agit comme régulateur de la conductance de la membrane apicale, en cas de mutations, les cellules ne délivrent plus d'ions chlorures dans le milieu extracellulaire (Ratjen et Döring 2003). Pour compenser la différence d'osmolarité causée par ces mutations, l'absorption d'ions sodium est augmentée *via* les canaux sodiques présents au niveau des épithéliums. Cette absorption va provoquer une augmentation de la différence de potentiel transépithéliale, alors supérieure à 35mV(Ratjen et Döring 2003).

Des données suggèrent que la protéine CFTR transporterait le bicarbonate ou régulerait son transport à travers la membrane des cellules épithéliales (Ratjen et Döring 2003).

Mais la protéine CFTR assure d'autres rôles, en effet elle est capable de réguler les pH des organelles intracellulaire, la sécrétion de certaines protéines comme les mucines, les glycoprotéines, et la production de protéines inflammatoires. Elle assure aussi le transport de l'ATP, du glutathion et favoriserait l'endo/exocytose (Ratjen et Döring 2003; Mehta 2005; Lyczak *et al.* 2000)

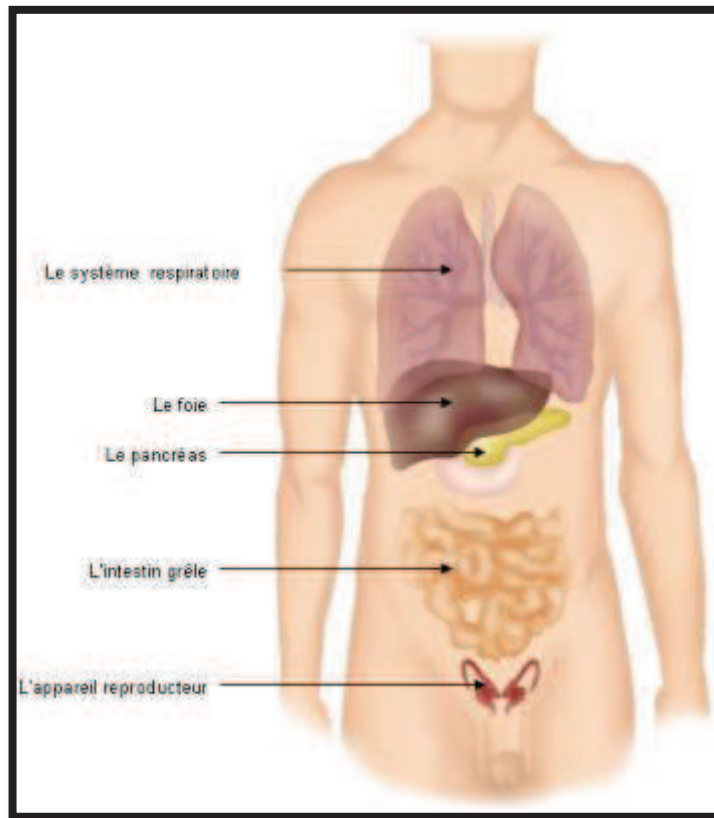


Figure 2: Organes touchés par la mucoviscidose.

C. Physiopathologie de la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie relativement bien connue du grand public de par sa médiatisation. Au niveau pulmonaire, les différentes mutations sur le gène CFTR provoque une absorption anormale d'ion sodium dans le lumen des voies respiratoires. Cette absorption associée à un défaut de sécrétion en ions chlorures serait responsable d'une concentration isotonique en sels, ce qui induirait un appauvrissement en eau du liquide périciliaire. La perte en eau au niveau du lumen augmente la viscosité du mucus et altère la clairance mucociliaire ainsi que celle de la toux (Ratjen and Döring 2003; Lyczak, Cannon, and Pier 2000)

La viscosité provoque un encombrement bronchique (Lyczak, *et al* 2000; Collins 1992). L'épithélium est envahi par les polynucléaires qui relarguent des élastases et des cytokines pro-inflammatoires aboutissant à une inflammation primitive. De plus, ce processus inflammatoire est exacerbé par les infections et engendre sur le long terme une hyperplasie des cellules glandulaires. Ces deux processus déclenchent des lésions pulmonaires. Liées aux troubles respiratoires obstructifs, ces lésions peuvent conduire à la destruction de l'épithélium. La destruction de l'épithélium participe à l'insuffisance respiratoire due à la dilatation progressive des bronches qui entraîne une morbidité chez 90% des patients (Lyczak *et al.* 2000; Cornelis and Dingemans 2013; Raisin 2014; Campodónico *et al.* 2008; Kipnis *et al.* 2006).

La mucoviscidose ne touche pas uniquement les poumons. En effet, la protéine CFTR n'est pas localisée uniquement au niveau pulmonaire, puisqu'elle est située au pôle apicale des cellules épithéliales, elle touche par conséquent de nombreux organes comme le pancréas, le tractus génital, le foie (Figure 2, p3 bis).

D. Les infections chez les patients atteints de la mucoviscidose

Les patients affectés par la mucoviscidose sont, en raison de leur état immunitaire et de l'état de leurs voies respiratoires, sujets à des infections bactériennes et fongiques. Ces infections sont liées notamment à l'épaississement et à la déshydratation du mucus bronchique. Ces deux phénomènes participent au piégeage des bactéries mais aussi des spores fongiques. De plus, ce type de mucus est un milieu particulièrement favorable à la croissance de ces micro-organismes, et limite leur élimination par le système immunitaire favorisant ainsi la détérioration de la vie et de la santé du patient, et par conséquent la mortalité des patients (Ratjen et Döring 2003; Collins 1992).

Selon certaines hypothèses les cellules épithéliales des voies respiratoires des patients atteints de la mucoviscidose auraient des propriétés similaires aux glandes sudoripares. Des défensines seraient inactivées par des concentrations en sels supérieures à 50mmol/L, permettant la multiplication des micro-organismes à la surface de l'épithélium (Ratjen et Döring 2003).

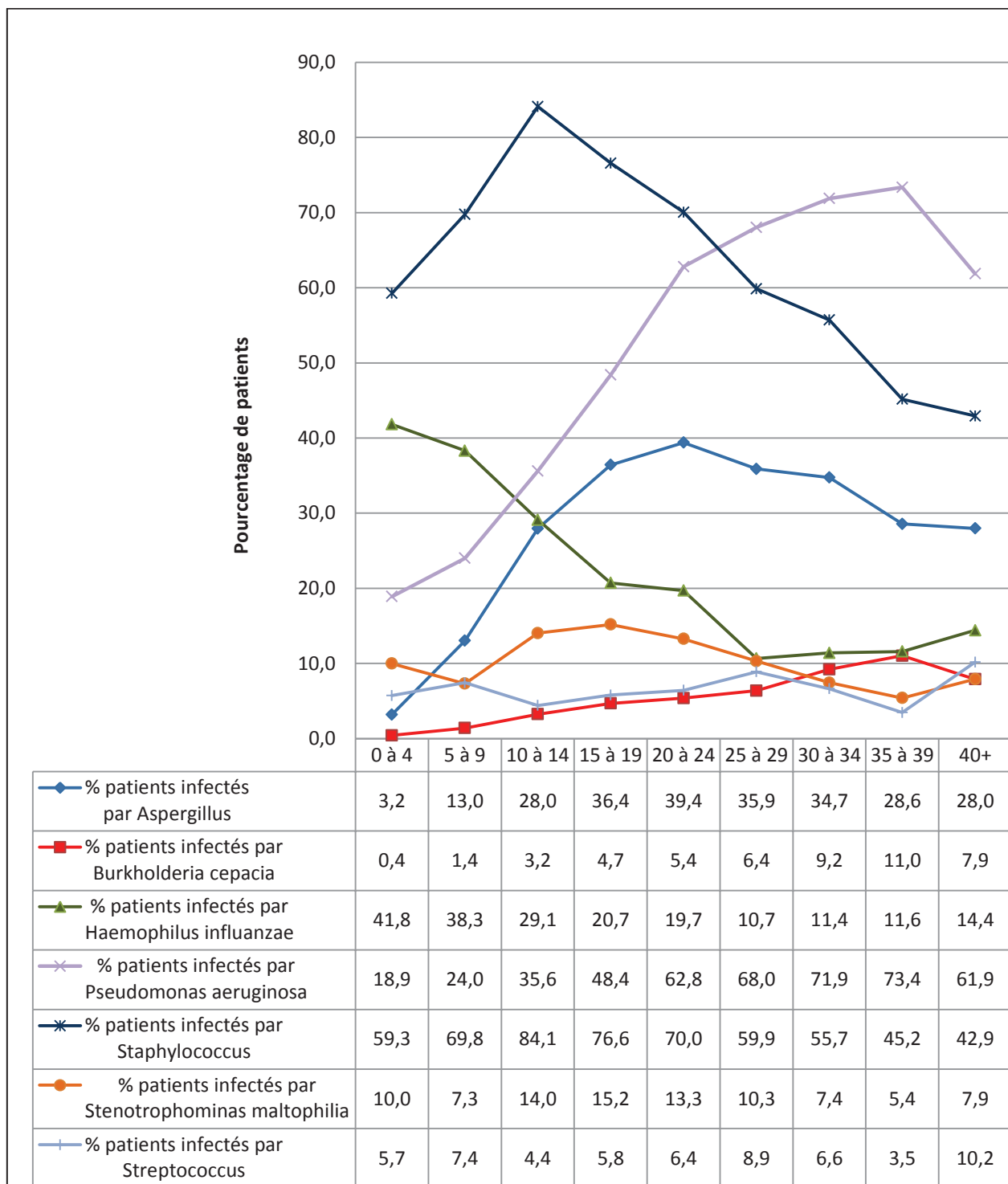


Figure 3: Colonisation/infection retrouvé en 2012 chez les patients souffrant de la mucoviscidose, lien entre agents infectieux et âge des patients (Registre Français de la mucoviscidose 2014)

1. Les infections bactériennes

P. aeruginosa est l'espèce la plus communément retrouvée chez les patients atteints de la mucoviscidose, mais elle n'est pas la seule, de nombreuses autres espèces peuvent coloniser ou infecter les patients telles que : *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, et *Stenotrophomonas maltophilia* (Registre Français de la mucoviscidose 2014; Ratjen et Döring 2003).

Il existe un lien entre l'âge et l'agent responsable de la colonisation/infection. Les patients sont souvent colonisés dans un premier temps par des *S. aureus*, et des *H. influenzae* ce qui nécessite l'administration d'antibiotiques comme la flucoxacilline durant 2 à 4 semaines (Ratjen et Döring 2003; Strausbaugh et Davis 2007) (Figure 3, p 4 bis). Dans certains centres, les bactéries des voies respiratoires sont totalement éradiquées par des antibiothérapies et ce même en absence de symptômes infectieux. En traitant par antibiotiques, l'éradication des bactéries des voies respiratoires est obtenue chez 75% des patients, cependant il existe des *S. aureus* qui sont capables de persister au niveau intracellulaire. Il a été démontré que l'infection à *S. aureus* favorise l'installation de *P. aeruginosa* en libérant des récepteurs épithéliaux permettant l'adhésion du bacille (Cornelis et Dingemans 2013)

A 6 ans, les premières infections à *P. aeruginosa* sont mises en évidence puis augmentent jusqu'à l'âge adulte où elles sont retrouvées chez près de 80% des patients (Registre Français de la mucoviscidose 2014; Strausbaugh et Davis 2007). Parallèlement à l'augmentation des infections à *P. aeruginosa* celles à *S. aureus* et à *H. influenzae* diminuent avec l'âge (Registre Français de la mucoviscidose 2014; Strausbaugh et Davis 2007).

P. aeruginosa provoque des infections aiguës ou chroniques, en fonction de l'état immunitaire de l'hôte et de ses facteurs de virulence. L'infection aiguë est caractérisée par la faculté d'invasion, la toxicité et la production de différents facteurs de virulence bactérien (lipopolysaccharide, adhésine, flagelle, protéase, exotoxine A sécrétée par le biais du TSS III) aboutissant à des atteintes tissulaires et à de fortes réactions inflammatoires (Campodónico *et al.* 2008; Kipnis *et al.* 2006). L'infection chronique est due à la persistance du micro-organisme qui va progressivement muter et perdre certains facteurs de virulence (pyocyanine, flagelle, acyl-homosérine lactone...), arrêter la sécrétion d'élastase, du TSS III et surproduire l'alginate permettant la formation d'un biofilm, *P. aeruginosa* devient alors de type mucoïde (Kipnis *et al.* 2006; Moreau-*et al.* 2008). Il n'est plus éliminé par le phénomène de toux et se retrouve protégé de l'immunité et des antibiotiques.

2. Les infections fongiques dans le cadre de la mucoviscidose

Les infections pulmonaires fongiques surviennent dans un second temps dans la mucoviscidose. En effet les premières infections bactériennes à *S. aureus* et *P. aeruginosa* apparaissent respectivement aux alentours de 5,4 ans et 8,1 ans, tandis que les infections fongiques interviennent plus tardivement

aux alentours de 13 ans (Figure 3, p 4 bis) (Registre Français de la mucoviscidose 2014; Cimon *et al.* 2007). La colonisation de l'appareil broncho-pulmonaire par des souches fongiques serait provoquée par les infections bactériennes précédentes. Ces infections entraînent une détérioration des poumons et plus particulièrement des cils, ce qui favoriserait l'installation des infections fongiques (Cimon *et al.* 2007).

Chez les patients, quatre champignons microscopiques, pouvant être responsable d'infections fongiques, sont principalement retrouvés. Il s'agit d'*Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium apiospermum*, *Exophiala dermatitidis* et *Aspergillus terreus* (Blyth *et al.* 2010; Cimon *et al.* 2007; Cimon *et al.* 2014).

Chez les patients non greffés, la pathologie la plus commune est l'aspergillose bronchopulmonaire allergique, causée par *A. fumigatus*. Ce champignon est retrouvé chez 46% des patients atteints par la mucoviscidose (Cimon *et al.* 2007).

Scedosporium apiospermum est le deuxième agent retrouvé dans les pathologies infectieuses à champignons filamenteux. La prévalence de *S. apiospermum* dans la colonisation bronchique est comprise entre 3 et 17,4% selon les études effectuées (Cimon *et al.* 2014; Cimon *et al.* 2007; Rougeron 2013). Ces différences s'expliquent par l'absence de standardisation des méthodes de détections. Ce champignon est en général responsable de colonisations chroniques mais quelques cas de mycose bronchopulmonaire allergiques ont été signalés (Cimon *et al.* 2007).

III. Le complexe *Scedosporium*

A. Historique

La première infection à *Scedosporium* a été découverte en 1889 dans une otite (Cortez *et al.* 2008). Il faudra attendre 1911 pour que la première souche soit isolée et nommée dans un premier temps *Monosporium apiospermum*, reconnu sous le nom de *Pseudallescheria boydii* à l'heure actuelle (Cortez *et al.* 2008). La nomenclature de ces champignons a évolué de nombreuses fois, ces évolutions sont en lien avec l'évolution de la taxonomie. C'est en 1955 que pour la première fois cette souche a été identifiée comme saprophyte dans les poumons. En 1991, le champignon a été pour la première fois isolé chez trois patients atteints de la mucoviscidose, mais il faudra attendre l'an 2000 pour que ce champignon soit reconnu comme responsable d'infections fongiques au cours de la mucoviscidose (Cortez *et al.* 2008; Lu *et al.* 2011)

B. Identification

L'identification peut être réalisée de plusieurs façons, elle peut reposer sur des critères morphologiques ou sur la biologie moléculaire.

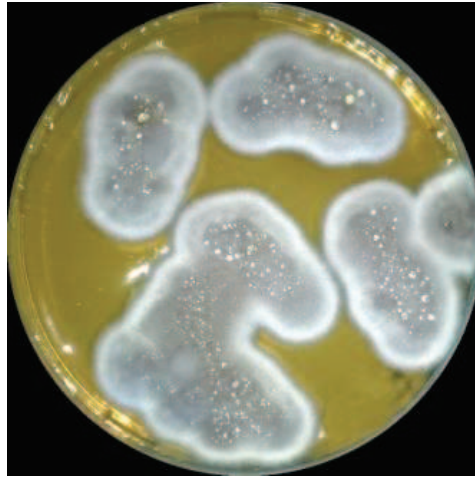


Figure 4: *Scedosporium apiospermum* sur milieu solide (YPDA).



Figure 5: Aspect microscopique des conidies de *Scedosporium apiospermum*.

3. Morphologie

L'identification grâce aux critères morphologiques demande une bonne connaissance et une bonne expérience dans l'identification des champignons, elle peut être réalisée de manière sereine uniquement par un manipulateur averti. Cette identification repose sur la morphologie macroscopique et microscopique de la souche fongique.

a) Aspect macroscopique

D'un point de vue macroscopique, au bout de 7 jours de culture sur milieu YPDA, les colonies présentent un aspect cotonneux. Dans un premier temps elles sont blanches, puis une coloration grise apparaît lors de la sporulation, et il peut y avoir excrétion d'exsudât (Figure 4, p 6 bis)

b) Aspect microscopique

Les espèces du complexe *Scedosporium apiospermum* sont composées d'hyphes hyalins non septés, présentant des ramifications au bout desquelles se trouvent des conidies de forme ovoïdes, et de taille comprise entre 4-9 x 6-10µm (Figure 5, p 6 bis)

Cependant l'analyse morphologique ne permet pas de distinction entre les différentes espèces de *Scedosporium* en raison du manque de caractères phénotypiques et de la plasticité morphologique (Alanio 2013). Pour avoir une identification sur ces paramètres, il faut tenir compte des conditions de culture qui influencent directement le phénotype de la souche. (Annexe 1)

L'identification peut reposer sur des paramètres biochimiques, notamment sur les sidérophores, ou encore sur la biologie moléculaire qui permettent une meilleure validation du résultat et la mise en place de la taxonomie

C. Taxonomie

La classification des champignons est de manière générale basée sur la morphologie de ces champignons. Mais les critères morphologiques sont insuffisants pour distinguer les espèces fongiques du complexe *Scedosporium* (Elad 2011). Cette classification a évolué avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire.

Les espèces de ce complexe font partie des ascomycètes, et plus particulièrement de l'ordre des Microascales, et appartiennent à la famille des Microascaceae (Lackner et al. 2012).

La taxonomie, de ce complexe de champignon, se fait grâce au séquençage des régions ITS (Internal Transcribed Spacer), mais ces régions offrent des résultats insuffisants pour distinguer les espèces du complexe *Scedosporium* (Gilgado et al. 2005; Gilgado et al. 2006; Gilgado et al. 2008; Gilgado et al. 2010; Rainer et al. 2000; Alanio 2013; Bernhardt et al. 2013). Deux gènes de la région TUB sont plutôt utilisés pour la taxonomie. Ils contiennent les gènes codants pour la β -tubuline, qui est un marqueur moléculaire fiable permettant de différencier les espèces du complexe *Scedosporium*. Ces régions sont amplifiées à partir d'amorces dégénérées (Lu et al. 2011; Alanio 2013). Une analyse phylogénique à partir des séquences, des gènes amplifiés est mise en place pour établir

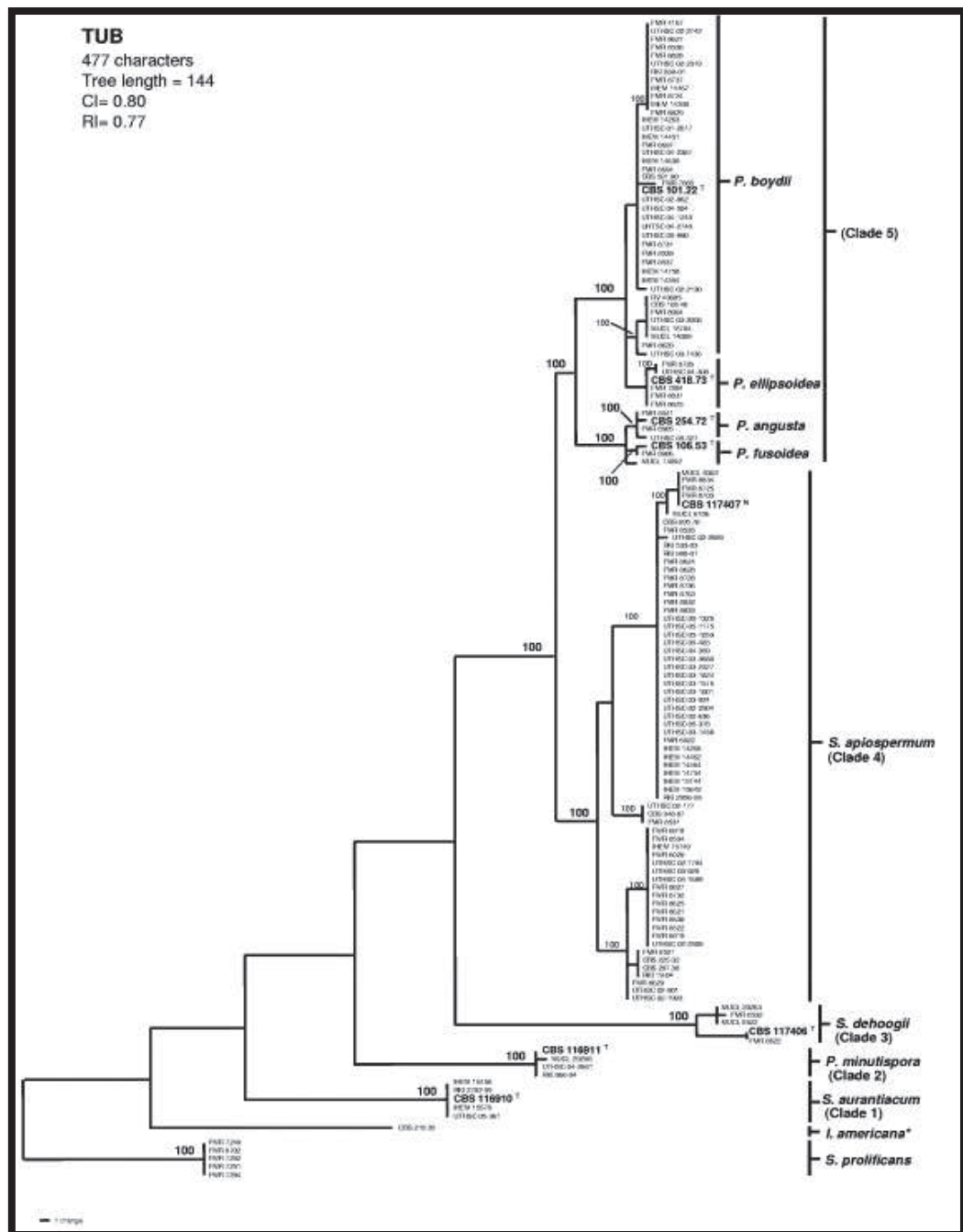


Figure 6: Un des Arbres phylogénétique du complexe *Scedosporium*, réalisé à partir des gènes TUB (Gilgado et al. 2006)

le lien phylogénique entre les espèces (Lu *et al.* 2011; Gilgado *et al.* 2008; Gilgado *et al.* 2005)(Lu *et al.* 2011)

Ces marqueurs moléculaires ont permis d'identifier 5 espèces dans le complexe *Scedosporium* (Lu *et al.* 2011; Kaltseis *et al.* 2009).

Le complexe *Scedosporium apiospermum* est constitué d'au moins cinq espèces parmi lesquels sont retrouvées (Figure 6, p 7 bis) (Lu *et al.* 2011; Gilgado *et al.* 2005; Gilgado *et al.* 2008; Alanio 2013; Bernhardt *et al.* 2013)

- *Scedosporium aurantiacum*, (espèce 1)
- *Pseudallescheria minutispora*, (espèce 2)
- *Scedosporium dehoogii*, (espèce 3)
- *Scedosporium apiospermum sensu stricto* (espèce 4)
- *Pseudallescheria boydii* qui comprend (espèce 5) :
 - o *Pseudallescheria boydii sensu stricto*,
 - o *Pseudallescheria angusta*,
 - o *Pseudallescheria ellipsoidea*
 - o *Pseudallescheria fusioidea*.

Par contre, l'espèce *Scedosporium prolificans*, n'appartient pas à ce complexe (Rougeron 2013; Bernhardt *et al.* 2013; Gilgado *et al.* 2005)

Dans l'étude de Gilgado, parue en 2007, les deux espèces : *S. apiospermum* et *P. boydii*, ont pu être distinguées. En effet pendant de nombreuses années en raison des similitudes morphologiques entre ces deux champignons, *S. apiospermum* était considéré comme la forme asexuée du champignon, tandis que *P. boydii* était considéré comme la forme sexuée du champignon (Cortez *et al.* 2008; Lackner *et al.* 2012). Il n'en est rien puisqu'en séquençant la région TUB, il a été montré qu'il s'agissait de deux espèces différentes (Kaltseis, *et al.* 2009).

D. Environnement

Les espèces du complexe *Scedosporium*, sont des champignons ubiquitaires, dont la niche écologique n'est pas connue. Ils sont retrouvés dans différents environnements contaminés par l'Homme, comme les sols industriels et agricoles (contenant des déjections animales), les eaux-polluées car ils sont capables d'effectuer la bioremédiation (Lackner *et al.* 2012; Cortez *et al.* 2008; Rougeron 2013; Kaltseis *et al.* 2009).

Mais ils peuvent être aussi retrouvés dans des zones urbaines comme les parcs. Une étude, portant sur la terre contenue dans les plantes d'intérieur, a montré la présence de *S. apiospermum* (Rougeron 2013; Sidot *et al.* 2007; Kaltseis, *et al.* 2009). Par contre, ils sont relativement peu retrouvés dans les environnements naturels (Sidot *et al.* 2007). Une corrélation positive a été établie entre l'abondance de *S. apiospermum* et une concentration élevée du milieu en ammoniac, ce qui expliquerait leurs localisations (Sidot *et al.* 2007).

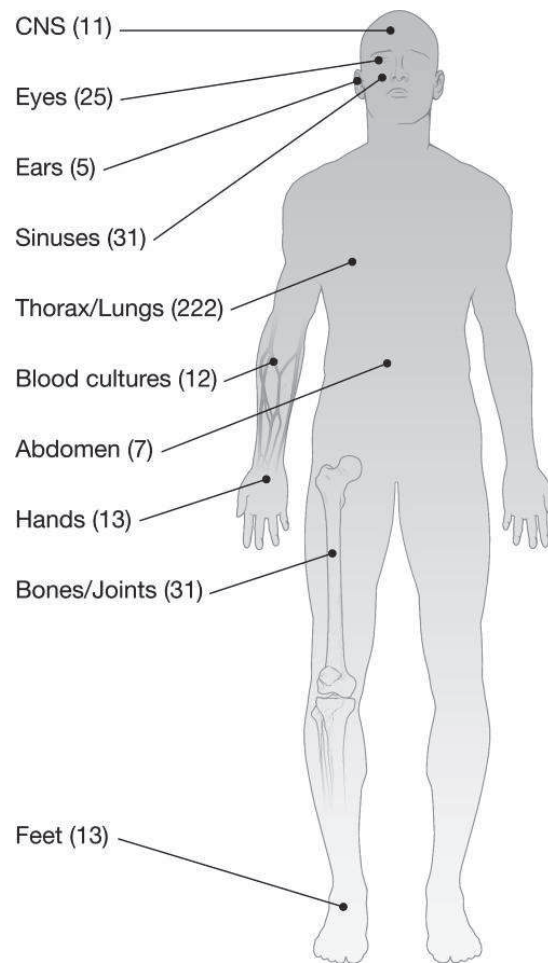


Figure 7: Organes et tissus infectés par des souches du complexe *Scedosporium* (Cortez *et al.* 2008).

La distribution des souches du complexe dans l'environnement est hétérogène, certaines souches sont retrouvées préférentiellement dans certains milieux (Sidot *et al.* 2007). Ces champignons se trouvent majoritairement dans les régions tempérées et sont peu fréquents dans les régions tropicales malgré leur tolérance thermique. Ils sont capables de survivre dans des milieux où la pression en oxygène est basse, et il tolère des concentrations en sels pouvant aller jusqu'à 5% (Rougeron 2013; Cortez *et al.* 2008).

E. Épidémiologie

Les espèces de ce complexe sont des pathogènes opportunistes, ils peuvent être des agents de colonisation ou responsables d'infections localisées ou disséminées dans différents organes (peau, poumon, tissu...) (Figure 7, p 8 bis) (Rougeron 2013; Cortez *et al.* 2008; Lackner *et al.* 2012). Les espèces du complexe sont responsables de trois types d'infections :

Les infections localisées, font suite à une inoculation traumatique et se développent chez des patients immunocompétents. Chez les immunodéprimés elles aboutissent à des scedosporioses invasives. Elles sont responsables d'infections chroniques des tissus cutanés et sous cutanés, comme des mycétomes, des arthrites, des ostéomyélites et des infections oculaires. En Europe et aux Etats Unis, *Scedosporium* est le principal agent des mycétomes à localisation plantaires (Rougeron 2013; Cortez *et al.* 2008).

Les infections résultant de colonisation des cavités naturelles, comme les poumons. Elles sont dues à des altérations, par exemple du tractus respiratoire, qui permettent l'inhalation des spores et leur germination au niveau pulmonaire. Le développement du champignon peut aboutir à la formation de boule fongique pulmonaire. Depuis quelques années des scedosporioses broncho-pulmonaires allergiques semblables à celle d'*Aspergillus* émergent (Rougeron 2013; Cortez *et al.* 2008).

Les infections systémiques invasives, font souvent suite à un épisode de presque noyade (suffocation par immersion dans un liquide) durant lequel des spores sont inhalées. Elles peuvent provoquer des scedosporioses pulmonaires invasives, des infections disséminées, notamment chez les immunodéprimées. Elles peuvent se localiser au niveau du système nerveux central ou elles sont responsables d'abcès au niveau du parenchyme cérébral (Rougeron 2013; Cortez *et al.* 2008).

Les champignons du complexe *Scedosporium*, sont retrouvés dans les infections pulmonaires en deuxième position après *A. fumigatus* dans le contexte de la mucoviscidose (Cimon *et al.* 2007). Ils sont impliqués dans la colonisation des voies respiratoires et de l'arbre respiratoire (Cimon *et al.* 2007). La colonisation et l'infection sont favorisées par le mucus particulier retrouvé chez les patients atteints de la mucoviscidose et font souvent suite à une infection bactérienne ayant diminuée les défenses de l'hôte (Kaltseis *et al.* 2009).

Les infections sont d'autant plus dangereuses, dans le contexte de la mucoviscidose, que les souches possèdent un pouvoir pathogène important et qu'elles sont naturellement résistantes à l'amphotérine B ainsi qu'aux azolés, ce qui rend leur traitement plus difficile (Lima *et al.* 2007). Il est donc important de trouver des antifongiques qui seront capables d'inhiber ou de limiter la croissance de ces champignons

La gravité de ces infections varie en fonction de l'état immunitaire de l'hôte, elles peuvent aller jusqu'à la mort du patient (Cortez *et al.* 2008). Elles sont particulièrement redoutées en période de post-transplantation et de pré-transplantation où le pronostic vital du patient sera engagé (Cortez *et al.* 2008).

F. Métabolites produits par les souches du complexe *Scedosporium*.

Il existe peu d'études sur les métabolites secondaires produits par les souches du complexe *S. apiospermum*, au contraire de chez *Aspergillus*, mais en raison de son émergence, et de son importance en pathologie, ses métabolites sont de plus en plus étudiés (Chabasse et 2009; Chabasse et Bouchara 1997).

Le tableau II (p 9 bis) présente les différents métabolites, référencés, synthétisés par les souches du complexe. Parmi ces molécules certaines possèdent une activité antimicrobienne, comme c'est le cas de la tyroscherine et de ses dérivés qui ont une activité antifongique ou bien encore la gliotoxine et ses dérivés qui possèdent une activité bactériostatique vis-à-vis des *Staphylococcus*, et ce même sur des souches résistantes à la méthicilline, voir multirésistantes.

IV. De la découverte des antimicrobiens à l'émergence de souches multirésistantes aux antimicrobiens.

Depuis longtemps, l'antagonisme entre les champignons et les bactéries est reconnue, puisque déjà en 1987, le Docteur Ernest Duchesne avait étudié l'interaction entre *Penicillium glaucum* et *E. coli*.

Les antibiotiques sont connus depuis les années 20, avec l'identification d'une molécule: la pénicilline, synthétisée par le genre *Penicillium*. Elle a été isolée par Norman Heatley.

L'utilisation des antibiotiques, a été très tôt suivie de l'apparition des résistances qui se sont répandues dans le monde bactérien. Il existe maintenant des souches multi-résistantes voir totalement résistantes, si bien que certaines infections aboutissent à des échecs thérapeutiques, ces infections sont par conséquent responsables d'une augmentation de la mortalité.

La résistance aux antibiotiques peut se faire selon deux mécanismes. Elles peuvent être dues à des mutations ponctuelles qui entraînent une résistance à une famille d'antibiotique. Ce type de résistance est ensuite transmis à la descendance. L'autre mécanisme est dû à l'acquisition de gènes induisant une résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques. Ces gènes sont issus à l'origine de souches qui

Tableau II: Récapitulatif des molécules synthétisées par les souches du complexe *Scedosporium*

Nom	Activité biologique	[M+H] ⁺ m/z	Formules brutes	Espèces	Réf
Pseurotine A	inhibiteur de la production en IgE	127.05	C ₅ H ₇ N ₂ O ₂	<i>P.boydii</i> IFM 4642	(“Pseurotin A Cayman Chemical Supplier” 2014; Pavlaskova <i>et al.</i> 2010)
AS-183	inhibiteur de l’acylCoA, pas d’activité antibactérienne à 100µg/mL	311.26	C ₁₉ H ₃₅ O ₃	<i>S.sp</i> -15549	(Kuroda <i>et al.</i> 1993)
Tyroscherine	antifongique	334.27	C ₂₁ H ₃₆ NO ₂	<i>P.sp</i>	(Nirma <i>et al.</i> 2013; Pavlaskova <i>et al.</i> 2010)
YM-193321	antifongique	346.27	C ₂₂ H ₃₆ NO ₂	<i>P.ellipsoidea</i> CBS128.78	(Katsuta <i>et al.</i> 2010; Kamigiri <i>et al.</i> 2004)
Gliotoxine	antibactérien activité anti-SARM	327.05	C ₁₃ H ₁₅ N ₂ O ₄ S ₂	<i>P.sp</i> MFB165	(Li <i>et al.</i> 2006)
Dehydroxybis dethio-bis (methylthio)gliotoxine	antibactérien activité anti-SARM	341.10	C ₁₅ H ₂₁ N ₂ O ₃ S ₂	<i>P.sp</i> MFB165	(Li <i>et al.</i> 2006)
Bisdethiobis(methyl-thio)-gliotoxine	antibactérien activité anti-SARM	357.10	C ₁₅ H ₂₁ N ₂ O ₄ S ₂	<i>P.sp</i> MFB165	(Li <i>et al.</i> 2006)

Nom	Activité biologique	[M+H] ⁺ m/z	Formules brutes	Espèces	Réf
Pseudacycline -A -B -C -D -E	rôle dans le métabolisme non connu, activité immunosuppressive, pas d'activité antimicrobienne	740.47 726.46 754.48 726.46 712.44	C ₃₉ H ₆₂ N ₇ O ₇ C ₃₈ H ₆₀ N ₇ O ₇ C ₄₀ H ₆₄ N ₇ O ₇ C ₃₈ H ₆₀ N ₇ O ₇ C ₃₇ H ₅₈ N ₇ O ₇	<i>P.boydii</i> CBS 119458	(Pavlaskova <i>et al.</i> 2010)
2-N-methylcoprogonine B	sidérophore	741.40	C ₃₄ H ₅₇ N ₆ O ₁₂	<i>S.aurantiacum</i> <i>S.apiospermum</i>	(Samuel Bertrand 2009)
Pseudalline	antifongique	257.04	C ₁₂ H ₁₀ O ₅ Na	<i>P. boydii</i> <i>TKF-4</i>	(Su <i>et al.</i> 2012)

possédaient naturellement une résistance aux antibiotiques et dont les gènes ont été transférés à d'autres souches selon plusieurs mécanismes possibles. Les différentes antibiothérapies ont permis une pression de sélection, qui a abouti au maintien et à la dissémination de ses gènes au sein des différentes familles ayant eux même la capacité d'acquérir et de maintenir ces gènes

Avec la dissémination de ces résistances, afin d'éviter les échecs thérapeutiques, il est important de découvrir de nouveaux antibiotiques.

Il est reconnu que les champignons, tels qu'*Aspergillus*, *Penicillium* sont capables de produire des antibiotiques, mais peu d'études ont été menés sur la synthèse de métabolites antimicrobiens par *Scedosporium*. Des molécules peuvent aussi être produites par des bactéries comme *Streptomyces* et *Bacillus*. De nombreuses études démontrent aussi la production par *Pseudomonas aeruginosa* de métabolites antimicrobiens, comme les phénazines, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol), qui sont doués d'une activité antifongique (Mezaache 2012; Haas *et al.* 2000). Certaines études ont démontré un lien entre la synthèse de pyoverdine par *P. aeruginosa* et l'activité antifongique (Varma et Chincholkar 2007), la pyoverdine ne serait pas directement un antifongique mais elle participerait à l'activité antifongique des autres molécules (Manwar *et al.* 2004).

Matériels et méthodes

Tableau III: Présentation des souches fongiques utilisées.

Familles	Espèces	Références	Numéro	Abrégé
<i>Pseudallescheria</i>	<i>boydii</i>	IHME/ LMA	15155/ 4 90 04595	<i>P. boydii</i> 4595
		LMA	110 350 137_01	<i>P. boydii</i> n°4
		IHME	14 457	
	<i>minuspora</i>	LMA	110 350 824_01 colonie 3	<i>P. minuspora</i> n°4
<i>Scedosporium</i>	<i>apiospermum</i>	IHME	14 462	
	<i>aurantiacum</i>	LMA	110 349 103_01 colonie 3	<i>S. aurantiacum</i> n°2
		LMA	120 008 827 01	
	<i>dehoogii</i>	LMA	110 350 905 01/4	
	<i>prolificans</i>	LMA	805 656 41 13	
<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>	CBS	113 26 1413	
	<i>terreus</i>	LMA	135 400 121 07	
<i>Exophiala</i>	<i>epidermitidis</i>	LMA	135 356 10 75	
<i>Ramsansonia</i>	<i>argillacea</i>			<i>R. argillacea</i> n°7

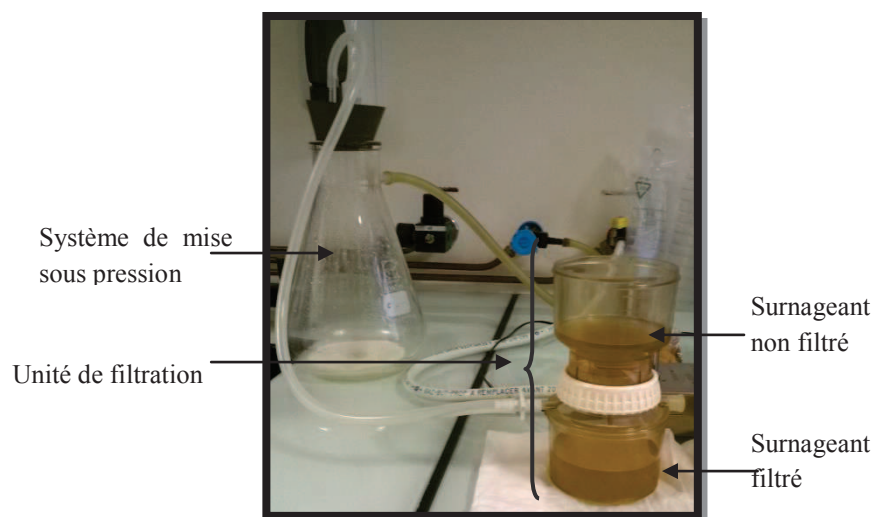


Figure 8: Illustration de la récupération des surnageants en utilisant une unité de filtration.

I. Matériels biologiques

A. Souches fongiques utilisées et cultures

1. Souches fongiques utilisées

Lors de cette étude différentes souches fongiques ont été utilisées. Elles figurent dans le Tableau III (p 11 bis).

2. Entretien des souches fongiques et culture en milieu solide

Les souches fongiques utilisées, ont été repiquées sur milieu YPDA (5g d'extrait de levure, 10g de peptone pancréatique, 20g glucose, 20g d'agar par litre de milieu) par une piqûre centrale puis 4 périphériques à partir de souches sur milieu solide.

Les souches issues de ce repiquage, ont été conservées en chambre froide à 4°C, en boîte de Pétri, pour en assurer l'entretien.

3. Récupération des spores

Après 7 jours d'incubation, pour chaque souche, les spores ont été récupérées à partir des milieux de culture solide avec 10 à 20mL d'eau ultra pure stérile par boîte. A l'aide d'un râteau stérile le milieu a été raclé, deux fois de suite pour récupérer le maximum de spores. La suspension obtenue a été filtrée à travers des filtres de porosité de 45µm, afin de séparer le mycélium des spores. Les filtrats obtenus ont été aliquotés par volume de 50mL et centrifugés durant 5 min à 4600 rpm à 4°C. Après centrifugation, les surnageants ont été éliminés et les culots repris avec 1mL d'eau ultra pure stérile avant d'être regroupés. Le nombre de spores a été déterminé en utilisant une cellule de Mallassez.

4. Culture en milieu liquide

Les cultures en milieu liquide ont été réalisées avec le milieu YPD liquide (5g d'extrait de levure, 10g de peptone pancréatique, 20g glucose par litre de milieu), à partir des culots précédemment obtenus, aux concentrations, températures, et volumes choisis, en fonction de l'analyse à effectuer.

5. Récupération des surnageants de culture fongique et lyophilisation.

Au bout de 7 jours, les surnageants ont été filtrés à travers plusieurs membranes de porosité décroissante [100µm, 45µm, 11µm (Millipore), 5µm (Millipore), 1µm (Sartorius), 0.45µm (Millipore)] *via* un système d'unité de filtration sous pression (Figure 8, p 11 bis). Le filtrat obtenu a été aliquoté par volume de 20 ml dans des tubes coniques stériles (Falcon) tarés dont le bouchon aura été préalablement percé puis recouvert de paraffine. Les tubes ont été dans un premier temps congelés inclinés à -20°C avant d'être transférés 30 min avant la lyophilisation à -80°C. Le film de paraffine a été enlevé puis les tubes ont été placés droit dans le lyophilisateur. La lyophilisation a été faite durant 2 jours grâce au lyophilisateur alpha 1-4 LS (Bioblock scientifique) avec comme caractéristiques de lyophilisation une température du condenseur à -61°C, une température du plateau à 19°C, et une pression de 0.570 mbar (Figure 9, p 12 bis).



Figure 9: Lyophilisateur alpha 1-4 LS.

Tableau IV: Présentation des souches bactériennes utilisées.

Familles	Espèces	Souches	Références	Numéro	Milieux de culture
<i>Bacille gram – non enterobactéries</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WT	CIP	P.a 01 WT	LBA
		Δ Las R	Université de Washington	P.a 1430	
		ΔExotoxine S		P.a 38 41 F5	
		ΔExotoxine A		P.a 1148	
		ΔAlginate		P.a 0765	
<i>Cocci gram +</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	WT	CIP	65.8 (1812)	LBA
		Résistants	CHU	140 019 822 06 (3)	LBA et gélose au sang
		Résistants	CHU	145 019 822 06 (2)	Gélose au sang
		Résistants	CHU	145 067 314 01	
		Résistants	CHU	140 038 779 01	
		Résistants	CHU	140 047 045 01	
		Résistants	CHU	140 004 564 01	
		Résistants	CHU	145 084 340 01	
		Résistants	CHU	145 008 821 01	
		Résistants	CHU	145 026 780 03	
	<i>Staphyococcus epidermidis</i>	WT	CIP	3813	LBA et gélose au sang
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	WT	CIP	104.971 (3813)	Gélose au sang
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	WT	CIP	4813	
	<i>Enterococcus Faecalis</i>	WT	CIP	4813	LBA
<i>Bacille gram - Enterobactéries</i>	<i>Escherichia coli</i>	WT	CIP	54.8 (4313)	LBA
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	WT	CIP	4813	
	<i>Serratia marcesens</i>	WT	CIP	3613	
<i>Bacille gram +</i>	<i>Bacillus cereus</i>	WT	CIP	4813	

B. Souches bactériennes utilisées et cultures

1. Souches bactériennes utilisées

Les souches bactériennes utilisées tout au long de l'étude sont présentées dans le tableau IV (p 12 bis). Toutes les souches proviennent de la collection Pasteur sauf les mutants de *P. aeruginosa* qui proviennent d'une banque de mutants réalisés par insertion aléatoire d'un transposon (Université de Washington). Les *Staphylococcus* présentant une résistance provenaient du laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers (Pr M-J Joly-Guiloux, Dr M Eveillard) et sont issus de prélèvements biologiques.

2. Culture en milieu solide

Les souches utilisées étaient présentées soit sur milieux solide ou dans du glycérol (*Pseudomonas wt* et mutants)

Les souches non exigeantes conservées sur gélose LBA (5g d'extrait de levure, 10g de tryptone, 20g de NaCl, 20g d'agar pour 1 litre de milieu) et dans du glycérol, ont été repiquées sur géloses LBA, incubées à 37°C durant 24h puis stockées en chambre froide et utilisées en fonction des besoins.

Les souches de *Staphylococcus* « résistantes » et les *Streptococcus* (plus exigeantes), été conservées sur gélose au sang (gélose columbia+ 5% sang de mouton, laboratoires Humeau,). Elles ont été repiquées sur ce même milieu puis incubées à 37°C durant 24h et stockées en chambre froide.

3. Culture de *Pseudomonas aeruginosa*

Une préculture a été réalisée avec la souche de référence Pa 01 WT. La souche utilisée était conservée à -80°C dans une solution de glycérol à 20%. Un aliquot de la solution de conservation a été prélevé directement sous forme de glace, puis incubée à 37°C toute une nuit dans 3mL de milieu LB liquide (5g d'extrait de levure, 10g de tryptone, 20g de NaCl pour 1 litre de milieu), sous agitation à 250 rpm.

Cinq cents microlitre de la préculture ont été incubés dans 25mL de milieu LB durant 7h à 37°C sous agitation à 250 rpm, cette manipulation a été réalisée en duplicat. Au bout de 7h d'incubation, différents volumes de cultures ont étéensemencés selon les conditions décrites dans le tableau V (p 13 bis). Ces suspensions bactériennes ont été incubées toute une nuit à 37°C sous agitation de 110 rpm..

4. Récupération des surnageants de cultures de *Pseudomonas aeruginosa*

Suite à cette incubation les différentes cultures bactériennes ont été centrifugées durant 25 min à 50 000g pour faire sédimenter les particules présentes. Ensuite chaque surnageant a été filtré successivement à travers différents de diamètres décroissants (5µm de diamètre (Millipore), puis de 1µm (Sartorius), et 0.45µm (Millipore)).

Tableau V: Culture de *Pseudomonas aeruginosa*.

Numéro	Volume de LB	Volume de culture Ensemencé
1	500mL (x2)	10mL
2	250 mL (x2)	5 mL
3	100 mL (x3)	2 mL
4	200mL (x1)	4 mL

Les filtrats obtenus pour chaque condition ont été aliquotés par volume de 20mL dans des tubes coniques stériles de 50mL (Falcon) en vue de la lyophilisation de la même manière que dans le paragraphe I-A-5

II. Inhibition de cultures, antibiogrammes et antifongigrammes

A. Mise au point des *inoculum*

1. Mise au point de l'*inoculum* fongique pour la réalisation des antifongigrammes

Le but était de déterminer l'*inoculum* fongique qui permettait d'obtenir au bout de 7 jours de culture, un recouvrement total de la surface du milieu gélosé par la moisissure.

Les champignons ont été ensemencés, à partir des culots obtenus lors de la récupération des spores, sur milieu YPDA à partir de différentes concentrations comprises entre 1×10^3 spores/mL et 2×10^9 spores/mL et selon différentes techniques : strie par écouvillonnage, inondations, râteau.

La technique des stries a été réalisée avec un écouvillon, en réalisant un ensemencement selon la méthode des trois cadrans. La technique d'inondation a été réalisée en déposant 1 à 2 mL de suspension de spore sur la gélose, et en tournant de manière à recouvrir la totalité de la surface, avant de récupérer le surplus. La technique du râteau a été utilisée en déposant 100µL d'une suspension de spores à la pipette et en étalant la suspension au râteau sur la totalité de la boîte.

Les milieux ont par la suite été incubés 7 jours à 37°C.

2. Mise au point de la technique de réalisation des antibiogrammes

Les antibiogrammes ont été réalisés pour identifier la technique la plus adaptée pour obtenir un recouvrement total de la gélose par les colonies bactériennes.

Ils ont été réalisés en suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie émis en 2013 (Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie 2013). Deux techniques ont été réalisées, celle des stries et celle par inondation. Pour toutes deux et pour toutes les souches une suspension dans de l'eau stérile est réalisée à une densité de 0.5 Mac Farland (10^8 UFC/mL).

La technique des stries a été réalisée avec un écouvillon stérile en utilisant une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de la suspension de densité 0.5 Mac Farland pour les souches non exigeantes et directement à partir du 0.5 Mac Farland pour les *Streptococcus*. La technique d'inondation a été réalisée en inondant la gélose avec 2mL d'une dilution au $1/100^{\text{ème}}$ du 0.5 Mac Farland pour les souches non exigeantes, et d'une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ pour les *Streptococcus*.

Les milieux ont été séchés puis incubés à 37°C durant 24h.

B. Inhibition de la croissance fongique

1. Réalisation des antifongigrammes

Les antifongigrammes ont été utilisés pour mettre en évidence une inhibition de la croissance des souches fongiques par les surnageants de culture de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les champignons présentés dans le tableau III (p 10 bis) ont été ensemencés, à partir des culots obtenus lors de la récupération des spores, sur milieu YPDA aux concentrations établit dans le paragraphe I-A-1 en utilisant la technique d'écouvillonnage. Les milieux ont été incubés 24 h à 37°C.

2. Inhibition de la croissance des espèces fongiques par les surnageants de culture de *P. aeruginosa*.

a) Préparation du surnageant de culture dont l'activité antifongique est testée.

Le lyophilisat de 20mL issue du surnageant de *P. aeruginosa* a été repris avec 1mL d'eau distillée stérile afin de concentrer les éléments par un facteur proche de 20. La même opération a été réalisée à partir du milieu LB lyophilisé pour la réalisation des contrôles.

b) Antifongigramme

Les boites ensemencées avec les champignons à J-1, ont été récupérées puis à J0, pour chacune des boites, un disque (12mm, Prat Dumas France) imbibé de 100µL de surnageant de culture bactérienne lyophilisé a été déposé. Cette opération a été réalisée en duplicat sur chacune des souches fongiques. Selon la même méthode pour chacune des souches fongiques, un témoin a été réalisé en imbibant le disque de milieu LB lyophilisé et non lyophilisé.

Les milieux ont été incubés à 37°C pendant 7 jours. Durant ces 7 jours des contrôles quotidiens ont été effectués pour visualiser une inhibition de croissance du champignon par le surnageant bactérien.

C. Inhibition de la croissance bactérienne

1. Réalisation des antibiogrammes

Les antibiogrammes ont été utilisés pour mettre en évidence une inhibition de la croissance des souches bactériennes par les surnageants de culture fongique.

Les souches bactériennes présentées dans le tableau IV (p 12 bis) ont été ensemencés, en suivant le protocole décrit dans le paragraphe I-A-1 en utilisant la technique d'écouvillonnage, sur les milieux propres à chacune des souches. Les milieux ont été séchés puis les disques imbibés de surnageants fongiques ou de milieu ont été déposés au centre des boites (12mm, Prat Dumas France). Une fois le dépôt effectué, les boites ont été séchées à l'air libre, avant d'être incubées dans l'étuve à 37°C, durant 24h. L'activité antibactérienne a été mise en évidence par la présence d'un halo d'inhibition autour du disque, dont le diamètre a été mesuré.

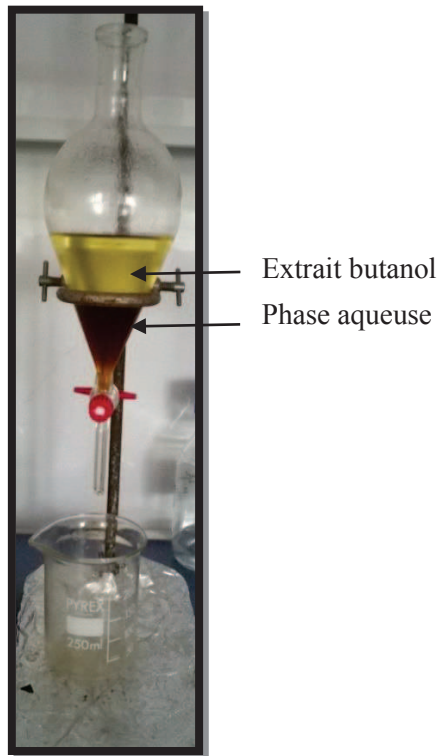


Figure 10: Extraction du surnageant de culture de *Pseudallescheria boydii* par le solvant butanol.

2. Inhibition de la culture des souches bactériennes par les surnageants de culture fongique

a) Préparation des surnageants de culture dont l'activité antibiotique est testée

Les lyophilisats issus des surnageant de culture fongique ont été repris avec 1mL d'eau distillée stérile afin de concentrer les éléments par un facteur proche de 20. La même opération a été réalisée à partir du milieu YPD lyophilisé pour la réalisation des contrôles

b) Antibiotogramme

L'antibiogramme est réalisé à partir des boîtes ensemencées avec les souches bactériennes, figurant dans le tableau IV, selon le protocole décrit dans le paragraphe II-B-1. Pour chacune des boîtes un disque imbibé de 100µL de surnageant de culture fongique, lyophilisé repris, a été déposé.

Cette opération a été réalisée en duplicat sur chacune des souches fongiques. Selon la même méthode pour chacune des souches bactériennes, un témoin a été réalisé en imbibant le disque de milieu YPD lyophilisé et non lyophilisé.

Les milieux ont été incubés à 37°C pendant 24h.

III. Purification et caractérisation des métabolites antibactériens sécrétés dans le surnageant de culture par *Pseudallescheria boydii* 4595

Le déroulement est présenté dans l'annexe 2.

A. Extraction des métabolites fongiques.

1. Préparation des échantillons à extraire.

Les lyophilisats des surnageants du champignon ont été repris avec 1mL d'eau ultra pure et regroupés pour permettre l'extraction de l'ensemble des composés.

Cette technique été réalisée trois fois avec des quantités croissantes de surnageant fongique (20ml, 600mL, 1 400mL).

2. Extraction liquide/liquide

L'extraction liquide/liquide est une technique de séparation assurant la séparation d'un mélange par l'intermédiaire de deux solvants non miscibles. La séparation est fonction du coefficient de répartition des composés du mélange, qui se répartissent entre les deux solvants en fonction de leur solubilité et de leur polarité. Après décantation, les deux phases séparées sont récupérées.

Cette technique a été utilisée pour déterminer la phase dans laquelle se situe l'activité du surnageant de culture de *P. boydii* 4595. Cette phase permet de déterminer la polarité des métabolites actifs.

L'extraction liquide/liquide par épuisement successif a été réalisée à l'aide de solvants de polarité croissante : le cyclohexane (C₆H₁₂), le dichlorométhane (DCM), l'acétate d'éthyle (AcOEt) et le butanol (BuOH) (sigma aldrich >99.8%,) dans cet ordre respectif. L'extraction a été réalisée avec un volume de solvant pour un volume d'échantillon. Cette étape a été réalisée dans une ampoule à décanter de 250mL, à raison de trois fois par solvant (Figure 10 p 15 bis) (BOURAHILA).

Tableau VI: Paramètres des solvants d'extraction.

Solvants	Densité g/mL	Pression d'évaporation	Pression d'évaporation rotavapeur R- 200 buchi
Cyclohexane	0.902	235 mbar	99 mbar
Dichlorométhane	1.33	Pression atmosphérique	461 mbar
Acétate d'éthyle	0.779	240 mbar	94 mbar
Butanol	0.8	25 mbar	7 mbar
Eau	1	72 mbar	23 mbar

Tableau VII: Gradient d'élution utilisé lors de l'HPLC analytique sur l'extrait dichlorométhane et acétate d'éthyle.

Temps (en min)	%Eau + 0.1% AF (A)	% ACN (B)	Débit mL/min
0	90	10	1
30	58	42	1

Tableau VIII: Gradient d'élution utilisé lors de l'HPLC analytique sur l'extrait cyclohexane

Temps (en min)	%Eau +0.1% AF	%ACN	Débit mL/min
0	98	2	1
5	98	2	1
10	85	15	1
20	5	95	1
40	5	95	1

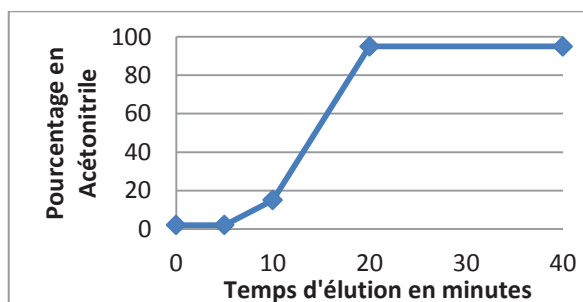


Figure 11: Gradient d'élution de l'extrait cyclohexane.

3. Evaporation des extraits

Les extraits obtenus ainsi que la phase aqueuse ont été évaporés grâce à un Rotavapeur R-200 (Butchi®). L'évaporation s'est fait à 100 rpm à une température de 40°C et à une pression propre à chaque solvant (tableau VI p 16 bis). Une fois le liquide totalement évaporé, le contenu de chacun des ballons a été repris avec du solvant et transféré dans un pilulier de 3mL à nouveau évaporé. Les masses des différents extraits évaporés ont été pesées.

4. Activités antibactériennes des extraits

Pour chacun des extraits une solution à 10mg/mL a été réalisée dans du DiMéthyl SulfOxide (DMSO, sigma aldrich). Les antibiogrammes ont été réalisés selon le principe décrit au paragraphe II-B-2, mais avec un volume de 30 µL pour imbiber les disques

B. Séparation et purification des molécules à activités antibactériennes.

1. Analyse des extraits par chromatographie liquide haute pression HPLC en phase inverse.

Le but est d'analyser la composition du mélange extrait selon les longueurs d'ondes d'absorption. Cette étape permet également, un contrôle des différentes étapes de séparation.

La chromatographie liquide haute pression est une technique de séparation basée sur l'adsorption des molécules. Ces molécules sont réparties entre la phase stationnaire solide et la phase mobile liquide. La phase stationnaire choisie est constituée de silice greffée de groupement C18. Cette phase est capable de retenir les composés les moins polaires. La phase mobile est composée d'un gradient polaire. Lorsque le gradient est composé majoritairement d'eau, les molécules les plus polaires sont décrochées, quand le gradient en eau diminue au profit de par exemple l'acétonitrile, ce sont les molécules plus apolaires qui sont décrochées et éluées. Plus le gradient s'enrichit en acétonitrile, plus la phase mobile devient apolaire. Elle devient plus apolaire que la phase stationnaire ce qui permet aux molécules de se détacher et d'être éluées.

a) Préparation des échantillons

Les extraits ont été dilués à une concentration de 5mg/mL ou 10mg/mL dans un mélange de 50% d'eau ultra pure et 50% d'acétonitrile (ACN). La solution obtenue a par la suite été filtrée à travers un filtre de cellulose ayant une porosité de 0.2nm (Interchim Uptidisc®).

b) HPLC analytique

L'analyse a été réalisée *via* le système Agilent 1100 HPLC (Agilent technologies): composé d'une pompe, d'un dégazeur, et d'un détecteur PDA UV-visible. La phase mobile est constituée d'un gradient d'eau ultra pure contenant 0.1% d'acide formique (Sigma aldrich,) (A) et d'ACN (B, Sigma aldrich chromosolv HPLC), l'élution a été réalisée avec un gradient programmé et optimisé selon l'extrait à analyser (tableau VII et VIII et figure 11, p 16 bis). Le débit choisi était d'un millilitre par minute. La phase stationnaire correspond à une colonne de type nucleosil C-18 (BDS hypersil C18

Tableau IX: Gradient d'élution utilisé lors de l'HPLC-ELSD sur les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle.

Temps (en min)	% Eau + 0.1% AF (A)	%ACN (B)	Débit mL/min
0	70	30	1
40	58	42	1
60	53	47	1

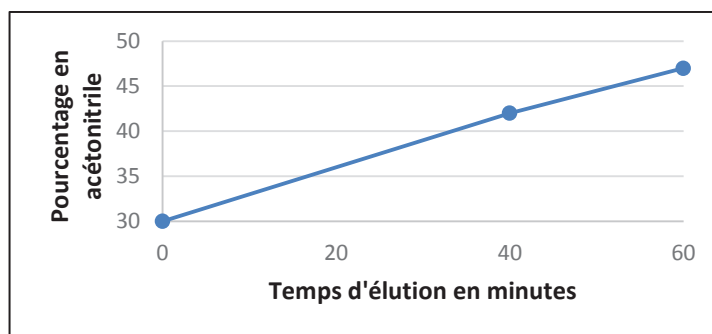


Figure 12: Gradient d'élution des extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle pour l'HPLC-ELSD.

thermoscientific) de dimension 250 x 4.6 mm, avec des particules de 5µm. Le volume d'injection était de 20µL. Les chromatogrammes sont observés aux longueurs d'ondes suivantes : 210 nm, 254.4 nm, 280 nm et 360 nm.(BOURAHILA 2013)

2. Chromatographie liquide haute pression couplée à un détecteur à diffusion de lumière (ELSD)

Cette analyse permet de détecter des composés non UV absorbables, comme par exemple la présence de peptides non cycliques suspectés dans la culture fongique. Cette technique repose sur le même principe que l'analyse par HPLC décrite dans le paragraphe III-B-1, mais l'automate est couplé à un détecteur à diffusion de lumière.

Les extraits cyclohexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle ont été préparés à une concentration de 5mg/mL. Lors de cette analyse, la colonne utilisée était celle ayant servi à l'HPLC analytique. Le gradient d'élution utilisé pour l'extrait cyclohexane figure dans le tableau VIII (p 16 bis) Pour les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle, le gradient d'élution utilisé est celui issu de la première optimisation (tableau IX, Figure 12, p 17 bis). Le détecteur à diffusion de lumière a été paramétré (Température d'évaporation : 60°C, Température de nébulisation : 60°C, Carrier Flow nominal : 1)

3. Identification des fractions à activité antibactérienne par chromatographie liquide haute pression semi préparative sur l'extrait dichlorométhane

Le but était d'identifier la zone d'élution, visualisable en HPLC, dans laquelle l'activité antibactérienne est située. Un fractionnement à partir de l'extrait dichlorométhane avec 5mg solubilisé dans un mélange de 50% ACN et 50% d'eau ultra pure. La colonne utilisée est la même que celle de l'HPLC analytique, le gradient utilisé lors de ce fractionnement de la première optimisation figurant dans le tableau IX (p 17 bis). A partir du profil HPLC, 5 fractions ont été réalisées.

L'activité antibactérienne des fractions obtenues a été testée selon le protocole indiqué dans le paragraphe III-A-4.

4. Séparation par chromatographie liquide haute pression semi préparative sur les extraits cyclohexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle.

Un micro fractionnement a été réalisé sur les extraits. Sur l'extrait cyclohexane, le fractionnement a été réalisé sur 5mg, pour les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle il a été réalisé sur 25mg d'extrait. Le protocole de préparation des échantillons est le même que dans le chapitre III-C-3. La colonne utilisée est la même que celle de l'HPLC analytique, tout comme les gradients dont les données figurent dans tableau VII et VIII (p 16 bis).

Les fractions ont été récupérées par intervalle de 30 secondes dans des microplaques de 96 puits. Les volumes de solvant collecté des différentes injections ont été regroupés puis évaporés, soit par les

rotavapeurs, soit par un évaporateur de plaques de Vegepolis, en respectant les paramètres d'évaporation de l'acétonitrile puis de l'eau.

Les fractions pour lesquelles, un profil chromatographique identique a été observé, ont été regroupées, séchées et pesées avant d'identifier les molécules.

C. Analyse des fractions à activité antibactérienne

1. Identification des molécules par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse.

L'objectif de cette analyse est de caractériser les pics d'absorption observables en UV par une masse afin de pouvoir caractériser les molécules, ainsi que d'identifier leurs structures.

La spectrométrie de masse est une technique qui consiste à ioniser des molécules, qui sont séparées en phases gazeuse en fonction de leur rapport masse sur charge. L'échantillon à analyser passe d'un état sous forme de goutte à celui de microgouttelettes contenant les molécules ionisées ou non. Ce changement de forme est influencé par un champ électrique qui permet de charger les molécules. Ce champ électrique additionné à un liquide permet la vaporisation de la goutte en gouttelettes, dont la charge est dépendante du mode d'ionisation. L'ionisation peut se faire selon deux modes, le mode positif ou le mode négatif. Les gouttelettes sont évaporées sous l'effet d'un courant d'air chauffé pour donner des microgouttelettes chargées. Elles sont désolvatées grâce à un potentiel électrique, à pression élevée ce qui va induire des collisions entre les molécules de gaz et le solvant. En variant le potentiel électrique, il est possible de fragmenter les molécules.

a) Préparation des échantillons

Les échantillons ont été préparés à différentes concentrations selon la quantité d'extrait à notre disposition (10mg/mL, 5mg/mL, 4mg/mL, ou 2mg/mL) dans un mélange 50% d'eau ultra pure et 50% d'acétonitrile.

b) Analyse

Lors de l'analyse la même colonne a été utilisée (voir III-B-1), les mêmes gradients d'élution ont été utilisés (Tableau VII et VIII, p 17 bis) par contre différents solvants ont été utilisés (Eau ultra pure +0.1% acide formique (Svahn *et al.* 2014) ; Eau ultra pure et acétonitrile (Kupfahl *et al.* 2008) ; Eau ultra pure +1mM de formiate d'ammonium et acétonitrile +1mM de formiate d'ammonium (Cerqueira *et al.* 2014))

Cette HPLC est couplée à un spectromètre de masse. L'analyse a été effectuée à la Plateforme d'Ingénierie et Analyses moléculaires (PIAM), avec l'appareil HPLC Water 2795 (Agilent technologies) couplé à un détecteur d'UV (Water 2487) et un spectromètre de masse basse résolution à trappe d'ions équipé d'une source electrospray Bruker Esquire 3000 (Gaz de nébulisation : azote ; débit de gaz : 7L/min ; pression : 30 psi ; température de vaporisation : 340°C, Gaz de fragmentation : hélium). L'ionisation a été réalisée en mode négatif et positif. Un volume de 20µL a été injecté lors de chacune ces analyses. Les résultats ont été traités avec le logiciel Bruker Daltonics DataAnalysis.

Tableau X : Gradient d'élution utilisé pour tous les échantillons en UPLC-MS.

Temps (en min)	% Eau (A)	%ACN (B)	Débit μL/min
0	95	5	450
0.5	95	5	450
9	5	95	450
11	5	95	450

Tableau XI: Paramètres d'UPLC-MS.

Gamme (unité de masse atomique)	150-1000
Spray voltage (V)	4000
Température de vaporisation (°C)	250
Sheath gas pressure	40
Température du capillaire (°C)	300
Tube lens off set	116
Skimmer off set	0

2. Identification des molécules par Chromatographie Liquide UltraPerformante couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS)

Il s'agit d'une chromatographie liquide couplée à un détecteur de masse, qui est plus sensible que la LC-MS. Elle permet de détecter des quantités plus faibles, et par conséquent elle est plus adaptée aux métabolites à en mettre évidence.

Les extraits totaux (cyclohexane, dichlorométhane, et acétate d'éthyle) ont été dilués à une concentration de 1mg/mL dans une mélange de 50% eau et 50% ACN (v/v).

Le gradient d'élution a été adapté à cette technique d'analyse figure dans le tableau X (p 18 bis). La colonne utilisée est de type nucléosil C18, d'une dimension de 100 x 2.10mm avec des particules de 100 Å. Les solvants d'élution utilisés sont l'eau et l'acétonitrile avec un débit de 450µL/min. L'analyse a été effectuée en mode positif et mode négatif. Les conditions ont été optimisées afin de permettre la détection. Elles figurent dans le tableau XI (p18 bis). L'analyse a été réalisée sur l'automate Accela (thermoscientific) couplé au détecteur de masse TSQ quantum acces max.

Résultats

Tableau XII: Mise au point de l'inoculum adéquat pour la réalisation des antifongigrammes.

Souches	Concentrations de l'inoculum (En spore/mL)
<i>A.fumigatus</i> CBS 113.26	5×10^5
<i>A.terreus</i> 135 400 121 07	5×10^5
<i>E.épidermitidis</i> 135 356 10 75	2×10^7
<i>P.boydii</i> 45 95	2×10^5
<i>P.boydii</i> n°4	2×10^5
<i>P.minuspora</i> n°4	1×10^6
<i>R.argillacea</i> n°7	1×10^6
<i>S.aurantiacum</i> n°2	2×10^6
<i>S.dehoogii</i> 110 350 905	2×10^5
<i>S.prolificans</i> 8056561413	2×10^5

I. Résultats préliminaires

Dans cette partie vont être exposés les résultats ayant initialisés l'étude.

Des expériences de co-culture entre *P. aeruginosa* et *P. boydii* 4595 ont été réalisées. Pour cela une gélose YPDA a été ensemencée avec une concentration de spores de 10^6 et 10^7 spores/mL, incubée une nuit à 37°C. Ensuite 10 µL (7×10^9 CFU/mL) de culture de *Pseudomonas aeruginosa* wt, ou de ses mutants, a été déposé au centre de la boîte. Après 7 jours d'incubation à 37°C, une zone d'inhibition a été observée, entre *P. boydii* et *P. aeruginosa* wt, ainsi que pour les mutants testés (Las R, Exotoxine A, TSS III, Alginate) (Figure 1, p 1 bis) Cette inhibition n'a pas été retrouvée entre la souche fongique et *Staphylococcus aureus*.

D'autres expériences ont été menées, afin de visualiser l'inhibition de la croissance de *P. aeruginosa* par le surnageant de culture de *P. boydii* 4595. Pour cela des cultures liquides de 200mL de *P. boydii* 4595 ont été ensemencées à des concentrations de 5×10^6 spores/mL, et incubée durant 7 jours à 37°C. Les surnageants ont été récupérés et lyophilisés par volume de 15mL. Les lyophilisats ont été repris avec 500µL d'eau stérile, concentrant ainsi les métabolites par un facteur 30, et testés par antibiogramme sur les souches bactériennes. Une inhibition de la croissance bactérienne de *P. aeruginosa* wt a été observée (Figure 1, p 1 bis). Cependant aucune inhibition de la croissance bactérienne des *Staphylococcus*, ni des mutants de *P. aeruginosa* n'a été observée.

II. Mise au point des techniques de réalisation des antifongigrammes et antibiogrammes

L'objectif était d'établir l'inoculum qui permettait de recouvrir la totalité de la gélose de la façon la plus homogène.

A. Mise au point de l'antifongigramme

La méthode d'ensemencement par écouvillonnage a été validée, celle-ci permettait d'ensemencer la gélose de manière uniforme, avec de bons résultats, et était reproductible même avec de faibles volumes de suspension au contraire des autres techniques.

L'inoculum de départ a été adapté pour chacune des souches, de manière à ce que le champignon recouvre la totalité de la gélose, les concentrations choisies pour chacune des souches sont représentées dans le tableau XII (p 20 bis).

B. Mise au point de l'antibiogramme

La méthode d'ensemencement par écouvillonnage a été validée puisqu'elle permettait d'obtenir un ensemencement uniforme de gélose au contraire de la technique d'ensemencement par inondation qui aboutissait à l'obtention d'un tapis trop dense.

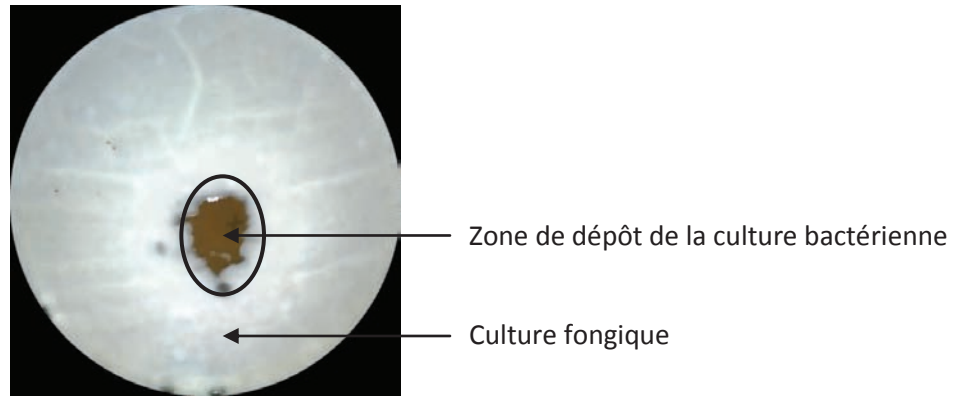


Figure 13: Illustration de la co-culture entre *P. aeruginosa* et *P. boydii* 4595.

III. Inhibition de croissance entre *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudallescheria boydii*

Dans un premier temps l'inhibition directe en co-culture entre *P. aeruginosa* Pa.01 WT et *P. boydii* 4595 a été recherchée.

Lors de la lecture de ce test, aucune inhibition de la croissance fongique n'est observée, mais dans le cas de *P. boydii* 4595 et *P. boydii* n°4, la souche fongique est présente à la périphérie de la culture bactérienne sans qu'il n'y ait d'envahissement de celle-ci (Figure 13, p 21bis). Pour les autres champignons testés, à savoir *P. minuspora* n°4, *A. fumigatus* CBS 113.26, *S. prolificans* 8056561413, le champignon envahit totalement la culture bactérienne. Lors de cette co-culture, aucune pigmentation verte due à la pyoverdine n'a été observée.

L'inhibition de la croissance entre *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudallescheria boydii*, n'a pas été reproduite.

IV. Mise en évidence de l'activité du surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa* sur la croissance fongique

Le but de cette étude était de mettre en évidence l'activité du surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa* sur la croissance fongique.

A. Surnageants de culture de *Pseudomonas aeruginosa* lyophilisés

Les lyophilisats résultants des différentes conditions de culture de *Pseudomonas aeruginosa* (Chapitre 2, I-B-2) ont été testés sur plusieurs espèces de champignons. Il n'y a pas de différence d'inhibition entre les témoins pour lesquels les disques ont été imprégnés de LB et les tests ou les disques ont été imprégnés de surnageant de culture.

Lors de la répétition des expériences, les mêmes résultats, à savoir aucune inhibition de la croissance fongique par le surnageant bactérien, ont été observés.

Les surnageants de culture de *Pseudomonas aeruginosa* testés ne présentent pas d'activité antifongique vis-à-vis des souches présentés dans le tableau XII (p 20 bis).

B. Surnageants de culture de *Pseudomonas aeruginosa* non lyophilisé

L'objectif était de déterminer si la lyophilisation pouvait être un processus responsable de la dégradation de la ou des molécules à potentiels antifongiques présentent dans le surnageant de culture bactérienne.

Suite à des problèmes de lyophilisation et au vu des résultats contradictoires avec les observations précédentes, le surnageant de culture bactérienne non lyophilisé a été testé.

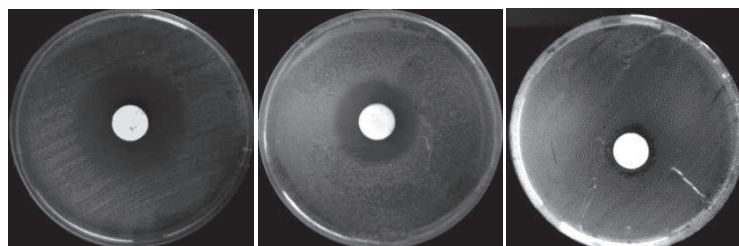


Figure 14: Inhibition de la croissance bactérienne par le surnageant de culture de *P. boydii* 4595 (surnageant 4). De gauche à droite, inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Staphylococcus epidermidis*, et de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau XIII: Résultats des antibiogrammes réalisés à partir des surnageants de culture *P. boydii* 4595 (n= nombre de réplication).

Conditions de culture	Inclinaison	Droit					Incliné			Témoin YPD
	Volume de milieu (en mL)	200				100	250			
	N° du surnageant	1	2	3	4	5	7	8	9	
		Moyenne des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne en mm (disque ≈ 12mm)								
		n=2								
Cocci gram +	<i>S. aureus</i>	18	16	34	37	37	23.5	20.5	16	0
	<i>S. epidermidis</i>	0	20	28	33	36.5	0	23.5	15	0
	<i>E. faecalis</i>	15	0	17	19	15	0	19	15.5	0
Bacille gram -	<i>P. aeruginosa</i>	0	18	15	20	15	15	16	0	0
		Zone moins dense					Zone moins dense			0
	<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>S. marcesens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bacillus gram +	B. .cereus	0	0	0	0	0	0	0	0

Aucune inhibition de la croissance des champignons quelle que soit l'espèce fongique utilisée n'a été observée. La culture fongique se développe au contact de la colonie bactérienne, et dans certains cas, elle colonise le disque sur lequel le surnageant bactérien non lyophilisé a été déposé.

En conclusion, le surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa* n'a pas d'activité antifongique.

V. Inhibition de la croissance bactérienne par le surnageant de culture de *P. boydii* 4595

A. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des surnageants

Dans un premier temps, l'activité antibactérienne a été recherchée dans le surnageant de culture fongique, et les conditions de culture adéquates pour la synthèse de métabolites antimicrobiens ont été identifiées.

Le surnageant de culture de *P. boydii* 4595, est capable d'inhiber la croissance des cocci gram +, notamment celle de *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. Cette activité antibactérienne a été retrouvée de manière constante pour ces souches, avec des diamètres de la zone d'inhibition de la croissance comprise entre 16 et 40 mm pour *S. aureus*. Pour *S. epidermidis* les diamètres d'inhibition étaient compris entre 16mm et 48mm. Ces résultats montrent la variabilité de la synthèse de métabolites secondaires par *P. boydii* 4595, puisque pour des conditions de cultures rigoureusement identiques, les diamètres d'inhibitions varient du simple au double. Dans le cas de *P. aeruginosa*, au bout de moins de 18h d'incubation, une zone de culture moins dense est observée à proximité des disques sur lesquels les surnageants ont été déposés, mais au bout de 24h d'incubation, cette zone moins dense n'est plus retrouvée. De manières générales les surnageants testés (numérotés de 1 à 10) ne permettent pas d'obtenir d'halo d'inhibition franc avec *P. aeruginosa*, ce qui n'est pas le cas avec les *Staphylococcus* (Tableau XIII, Figure 14, p 22 bis).

De manière plus ponctuelle, une inhibition de la croissance d'*Enterococcus faecalis* a été retrouvée. De plus, le surnageant fongique n'a pas d'activité antibactérienne sur l'ensemble des bacilles gram – testés (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcesens*, et *B. cereus*).

Les tests ont également été réalisés avec les surnageants de culture non lyophilisés. Dans ces conditions aucune inhibition de la croissance bactérienne n'a été mise en évidence. Il semble donc que l'étape de lyophilisation soit un processus essentiel qui permet de concentrer les molécules potentiellement à activité antibactérienne.

La synthèse de métabolites secondaires par *P. boydii* 4595 est très variable comme le montre le tableau XIII. La synthèse de ces métabolites semble variée en fonction de la surface d'oxygénation du

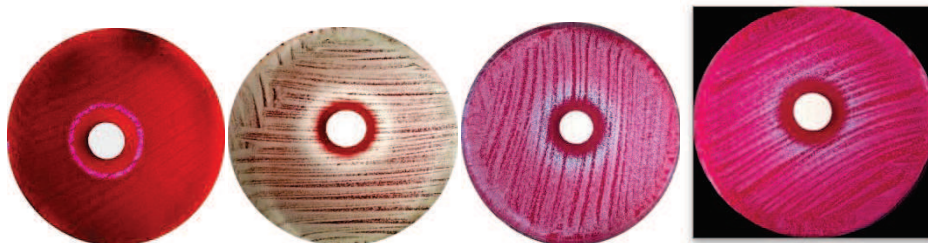


Figure 15: Inhibition de la croissance de souches de *Staphylococcus aureus* par le surnageant n°3. De gauche à droite, souche 140 019 0822 060(3), souche 145 008 821 01, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*

Tableau XIV : Résultats des antibiogrammes réalisés sur *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et des souches de *Staphylococcus aureus* présentant des résistances aux antibiotiques. (n : nombre de réplication par surnageant)

N°	Moyenne des diamètres de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne (en mm) n=2		
	surnageant 3	surnageant 4	Témoin YPD
<i>S.aureus</i>	25	37	0
<i>t.epidermidis</i>	25	33	0
140 019 822 06 (3)	24	25	0
145 019 822 06 (2)	0	22	0
145 067 314 01	0	20	0
140 038 779 01	0	0	0
140 047 045 01	19	22	0
140 004 564 01	21	19	0
145 084 340 01	20	21	0
145 008 821 01	16	20	0
145 026 780 03	19	19	0

milieu. Lorsque le milieu de culture est incliné pendant l'incubation, la surface d'oxygénation est plus importante et dans ce cas l'activité antibactérienne est amoindrie.

A la vue des résultats expérimentaux, il a été décidé pour la suite des expériences de réaliser les cultures bactériennes sur le même modèle que le surnageant n°4, qui présentait une activité à la fois dirigée contre les *Staphylococcus* et *Pseudomonas*. Ces cultures ont donc été réalisées selon le même modèle, c'est-à-dire en réalisant une culture de la souche fongique dans 200mL d'YPD, dans un flacon droit, à une concentration de 5×10^6 spore/mL puisque que c'est pour ces conditions qu'une activité antibactérienne a été mise en évidence vis-à-vis des *Staphylococcus* et de *P. aeruginosa*.

B. Mise en évidence de l'activité des surnageants de *P.boydii* 4595 sur la croissance de souches de *Staphylococcus* résistantes aux antibiotiques.

Suite à ces résultats qui montrent principalement une inhibition de la croissance des espèces du genre *Staphylococcus* par les surnageants fongiques. Ainsi, l'étude a été élargie sur d'autres souches de *Staphylococcus* résistantes aux antibiotiques. Pour cela, des antibiogrammes sur des souches présentant divers profils de résistance aux antibiotiques ont été réalisés avec les surnageants 3 et 4, pour lesquels une activité anti-*Staphylococcus* avait été observée (Tableau XIII, p22 bis).

En parallèle, l'activité des surnageants a été contrôlée, et validée sur les souches de *S. aureus* et *S. epidermidis* utilisées lors de la première évaluation avec des valeurs de diamètre d'inhibition de même ordre de grandeur que ceux qui avait précédemment été observés (Tableau XIV, Figure 15, p 23bis).

Les surnageants de culture de *P. boydii* 4595 testés, présentent une activité antibactérienne sur la plupart des souches de *Staphylococcus aureus* résistants aux antibiotiques. Les valeurs des diamètres d'inhibition étaient compris entre 16 et 25mm (Tableau XIV, Figure 15).

C. Détermination de l'impact de la température sur la synthèse de métabolites à activité antibactérienne.

Dans un deuxième temps, l'étude s'est portée sur l'impact de la température sur la synthèse de métabolites à activité antibactérienne. Le but de cette étude était de déterminer la température d'incubation de *P. boydii* 4595 la plus adéquate à la synthèse des métabolites. Différentes températures d'incubation ont été testées (25, 30, 37 et 40°C) et les antibiogrammes réalisés avec les surnageants lyophilisés provenant des diverses conditions de températures ont été réalisés (Tableau XV, p 24 bis Tableau XV).

L'inhibition de la croissance des *Staphylococcus*, préalablement démontrée, a été retrouvée uniquement à certaines températures. Une hétérogénéité est donc noter, ce qui signe le caractère aléatoire de la synthèse de métabolites par *P. boydii* 4595 en fonction de la température. Aucune inhibition de la croissance des souches de *P. aeruginosa* par les différents surnageants fongiques n'a été observée. Il semble que la ou les molécule(s) à potentiel antibactérien soient synthétisée(s) pour des températures de 25°C, 30°C et 37°C, avec un diamètre de la zone d'inhibition plus important à 37°C. A 40°C, le champignon s'est très peu développé et il ne présente aucune activité

Tableau XV: Résultats des antibiogrammes réalisés à partir des surnageants issues des incubations à différentes températures. (n : nombre de réplifications).

Volume milieu (en mL)		200						
Température (en °C)		25		30		37		40
Inclinaison		Droit	Incliné	Droit	Incliné	Droit	Incliné	Droit
[spore/mL]		3.25 x 10 ⁶						
		Moyenne des diamètres de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne (en mm) n=2						
Cocci gram ⁺	<i>S. aureus</i>	17.5	0	0	19.5	0	22	0
	<i>S. epidermidis</i>	16.5	0	0	17.5	0	0	0
	<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0
Bacille gram -	<i>P. aeruginosa</i> 01 WT	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. aeruginosa</i> 1430 B10	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. aeruginosa</i> 3845 F5	0	0	0	0	0	0	0
	<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>S. marcesens</i>	0	0	0	0	0	0	0

Tableau XVI: Résultats des masses obtenues pour chaque extrait.

	Extraits	Cyclohexane	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	Butanol	Phase aqueuse
Volume de surnageant	20 mL	21.5 mg	15.8 mg	7.3 mg	327.7 mg	144 mg
	600 mL	19.6 mg	36.6 mg	ND	ND	5 g
	1400 mL	6.7 mg	55.7 mg	50.1 mg	7,300 g	12 g

Tableau XVII: Résultats des tests d'inhibitions avec les extraits résultants de l'extraction liquide/liquide des surnageants de culture de *P.boydii* 4595 (surnageant 4) ND : Non déterminé en raison d'un problème technique.

Extraits	Cyclohexane	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	Butanol	Phase aqueuse	Témoin DMSO
Moyenne des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne (en mm, n=2)						
<i>P. aeruginosa</i> PA01 WT	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	18.5	17.5	20	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	0	0

antibactérienne. De plus, il est observé que le caractère incliné des cultures ne favorise pas l'inhibition. Ces données, bien que non statistiquement significatives, montrent que la température d'incubation à 37°C, et des cultures droites sont des caractères adéquats pour la recherche d'une activité antibactérienne.

VI. Purification et caractérisation des métabolites antibactériens sécrétés dans le surnageant de culture de *P.boydii* 4595.

L'objectif est de fractionner le surnageant en différents extraits organiques afin de purifier les métabolites responsables de l'activité.

A. Résultats des extractions

L'extraction a été réalisée, par trois fois sur des volumes de plus en plus important, afin d'avoir suffisamment de quantité d'extrait pour tester l'activité antibactérienne. L'extraction a permis de séparer les molécules en fonction de leur polarité, les plus apolaires ont été extraites par le cyclohexane, tandis que les plus polaires sont restées dans la phase aqueuse. Les masses les plus importantes ont été recueillies pour les extraits butanoliques et les phases aqueuses, comme le montre le tableau XVI (p 24 bis).

En outre, la composition HPLC analytique/UV du milieu de culture *versus* celle de chaque extrait montre un bruit de fond non significatif validant la présence d'autres molécules.

B. Identification des extraits présentant une activité antibactérienne

Dans un premier temps, afin de cibler l'activité antibactérienne, les cinq extraits obtenus ont été testés pour leur activité antibactérienne (Tableau XVII, p 24 bis). En parallèles, les extraits issues du milieu de culture ont été testés et ont servi à la réalisation des témoins. Des témoins ont été réalisés avec du DMSO afin de vérifier qu'il n'avait pas d'activité antibactérienne. Ces extraits et les témoins DMSO n'ont montré aucune activité antibactérienne vis-à-vis des souches testées.

Les extraits obtenus ont été testés, afin d'identifier les fractions présentant un intérêt pour notre étude. Les antibiogrammes ont été réalisés sur *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* et *E. faecalis*. Les extraits cyclohexane, dichlorométhane, et acétate d'éthyle ont été identifiés comme présentant une activité antibactérienne vis-à-vis des *Staphylococcus aureus* avec des moyennes de zone d'inhibition de 17.5mm à 20mm, par contre l'inhibition de la croissance de *Staphylococcus epidermidis*, n'a pas été retrouvée (Tableau XVII, p 24 bis). Les expériences précédentes avaient démontré une activité antibactérienne pour l'extrait dichlorométhane sur *Staphylococcus aureus* (Breuil Alexandre).

D'après ces résultats, l'étude se concentrera en premier lieu sur l'extrait dichlorométhane puis sur les extraits cyclohexane et acétate d'éthyle. Ces trois extraits sont peu concentrés en métabolites comme le montre le tableau XVI (p 24 bis) et non proportionnel au volume d'extraction.

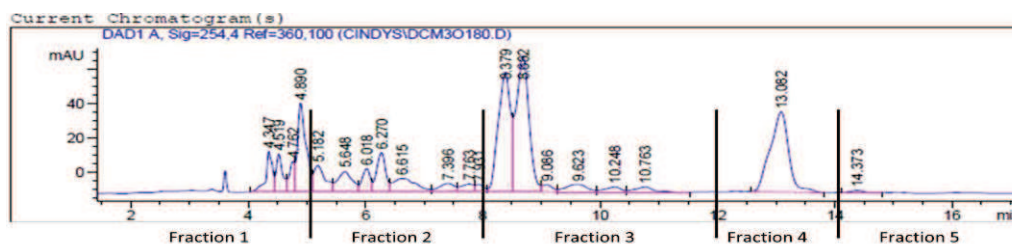


Figure 16 : Profil HPLC à 254nm ayant servie à l'établissement des fractions. Concentration de l'extrait à 45mg/mL

Tableau XVIII: Réalisation des fractions sur l'extrait dichlorométhane et identification des fractions douées d'une activité antibactérienne, NT : non testé

N° Fractions	Temps d'élutions	Quantité en mg	Moyenne des Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne (en mm, n=2)	
			<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
1	0 à 5 min	3	0	0
2	5 à 8 min	1.5	20	0
3	8 à 12min	<1	NT	NT
4	12 à 14min	3.3	0	0
5	14 à 60 min	2	0	0

Tableau XIX: Fractions récupérées lors de l'HPLC préparative de l'extrait dichlorométhane

Fractions	Temps de rétention	Masse d'extrait (en mg)
H1	3 à 4.5 min	3.7
H6	18 à 20 min	1.2
A6	20 à 23 min	2.8
F7	24 à 26 min	1.1
H7	26 à 29 min	3.3

3. Séparation en 5 fractions de l'extrait

La séparation en 5 fractions a été effectuée selon le profil d'HPLC analytique couplée à l'UV, sur une quantité de 17,1mg, selon le profil à 254 nm présenté dans la figure 16. Le but de cette séparation était d'identifier la zone d'élution dans laquelle se situe la ou les molécules à activité antibactérienne. La purification et la caractérisation seront ainsi facilitées. Les faibles quantités de surnageant de culture obtenues imposent de faire séparément les tests d'activité et la purification (Tableau XVIII, p 24 bis). Les activités antibactériennes des fractions réalisées ont été testées (Tableau XVIII, p 25 bis)

L'activité antibactérienne a été retrouvée pour la fraction n°2, qui correspond à des temps de rétention compris entre 5 et 8 min. Cette fraction est capable d'inhiber la croissance de *S. aureus*. Le profil HPLC de la fraction n°2. En raison de la faible masse obtenue de la fraction 3, son activité n'a pas pu être évaluée (Tableau XVII, p 25 bis).

L'activité antibactérienne a été identifiée pour des temps de rétention de 5 et 8 min ce qui correspond respectivement à une élution comprise entre 31 et 33% d'ACN, d'après le gradient d'élution utilisé (Tableau IX, p 17 bis).

4. Microfractionnement de l'extrait dichlorométhane pour isoler la ou les molécules à activité antibactérienne

Le but de cette analyse était d'isoler et d'identifier précisément la fraction contenant la molécule à activité antibactérienne. Les profils HPLC complets sont présentés dans la figure 17 (p 25 ter). Les fractions correspondant à la zone d'activité ont été regroupées selon un profil HPLC-UV identique (Tableau XIX, p 25 bis).

Avec le gradient d'élution utilisé lors de l'HPLC préparative (tableau VII, p 17 bis), les temps de rétention en analytique de 5 à 8 min correspondent ici à des temps d'élution compris entre 19,5 et 23min. Les fractions actives correspondant à ces temps de rétention (nommées H6 et A6) ont été récupérées et analysées en priorité.

a) Analyse des fractions A6 et H 6 par spectrométrie de masse (infusion)

Les masses résultantes des infusions réalisées sur ces deux fractions sont présentées dans les tableaux XX p 25 ter et XIX p 25 quat .

Les masses observées ne correspondent pas à celles décrites dans la littérature pour des molécules du complexe *Scedosporium*. Ces résultats laissent espérer l'obtention de structures chimiques originales les fractions sont en cours d'analyse RMN ^1H et ^{13}C .

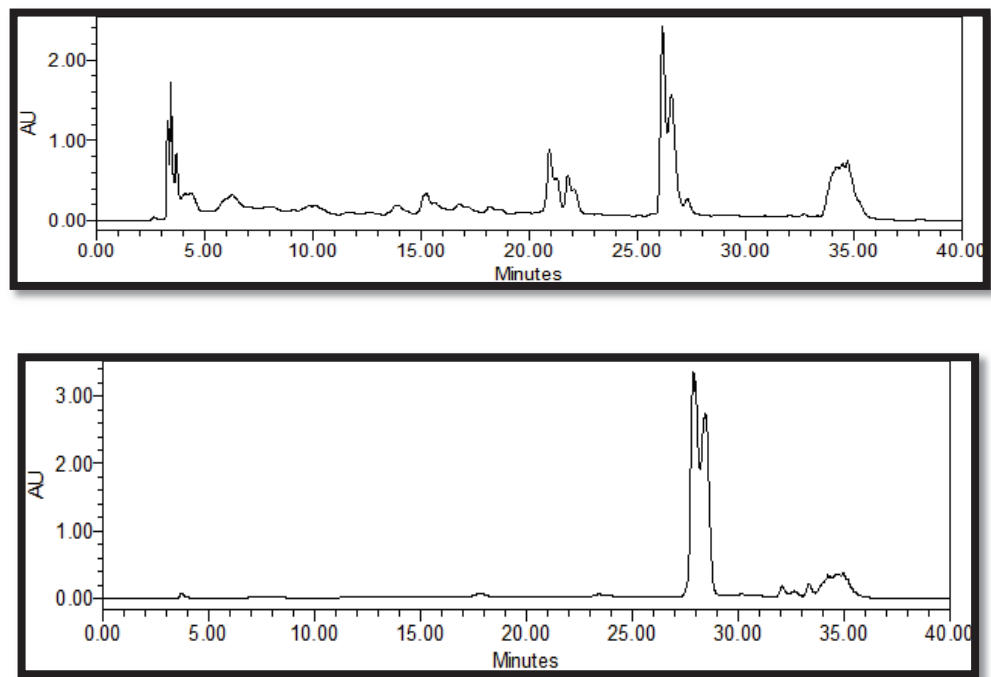


Figure 17: Profil HPLC de l'extrait dichlorométhane sur lequel l'HPLC préparative a été réalisé, au-dessus le profil à 254nm, en dessous le profil à 360nm.

Tableau XX: Résultats de l'infusion en spectrométrie de masse de la fraction H6 de l'extrait dichlorométhane

Fraction H6	
[M + H] m/z	MS 2
179	
217.1	
276.1	
308.1	
338.1	
321.7	152.8
	192.7
	255.7

Tableau XXI: Résultats des infusions en spectrométrie de masses de la fraction A6 de l'extrait dichlorométhane.

Fraction A6	
[M+ H] m/z	MS2
101.4	
254	224.8
	208.7
	197.7
274.1	626
	257
	256
	191.3
	174
276	288.4
	258.1
	130.1
338.1	
528.2	
572.2	
949.7	

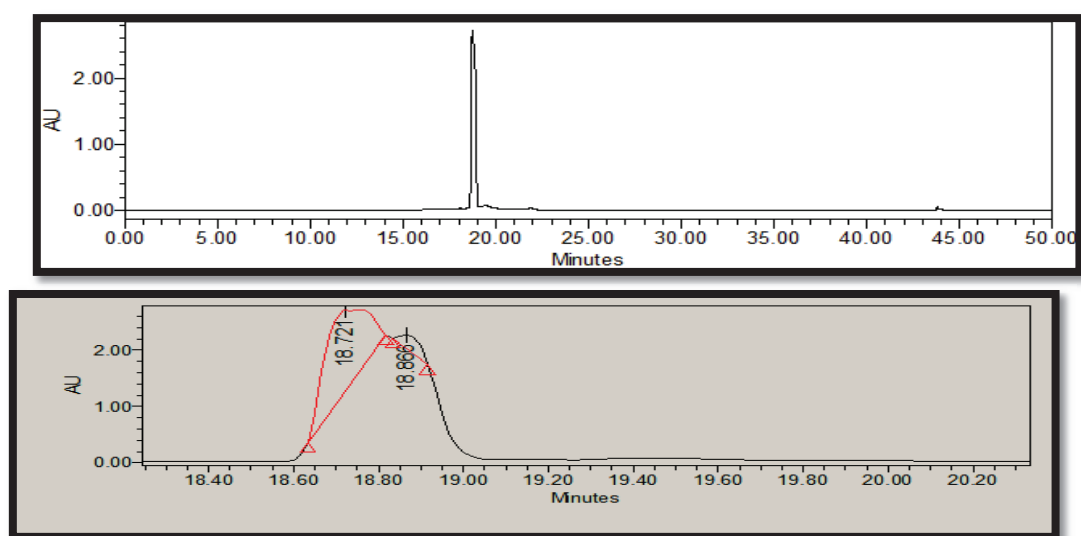


Figure 18: Profil HPLC à 360nm de l'extrait cyclohexane, au dessus le profil complet, en dessous un agrandissement a été réalisé sur le pic.

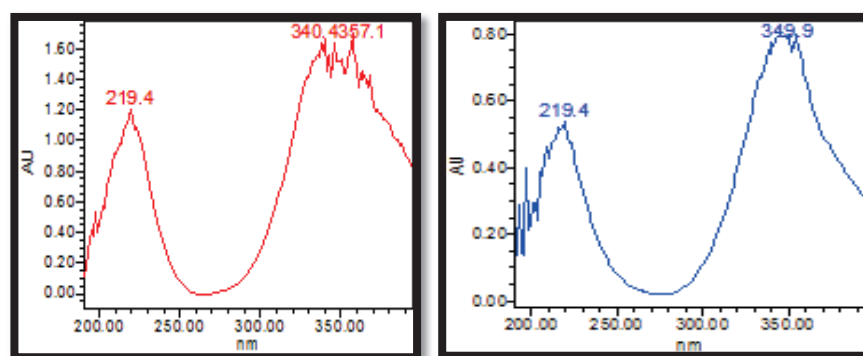


Figure 19: Chromatogramme des pics obtenus à 360nm, à droite celui correspondant au temps de rétention de 18.721min et à gauche celui correspondant au temps de rétention de 18.866min.

C. Purification des métabolites à activité antibactérienne de l'extrait cyclohexane

1. HPLC analytique UV couplée à la spectrométrie de masse

L'analyse HPLC/MS de l'extrait cyclohexane total par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, présente deux pics très proches en temps de rétention, apparaissant un seul massif majoritaire à 360 nm (figure 20 p 25 ter). Ces pics correspondent à une valeur de m/z de 307,91 en mode négatif soit une masse de $m/z = 309$. Ce massif doit correspondre à l'activité obtenue, étant l'absence d'autres pics dans cet extrait actif.

2. Micro fractionnement de l'extrait cyclohexane

Le but de cette analyse était d'isoler et d'identifier le massif observé en HPLC/MS contenant la ou les molécules à activité antibactérienne. L'analyse du profil d'HPLC/UV du massif isolé (3,8 mg) a montré deux pics de temps de rétention respectivement de 18,70 min et 18,90 min absorbant à 360 nm (figure 18, p 26 bis). Ces pics présentent un profil similaire d'absorption dans l'UV (Figure 19, p 26 bis) avec simplement un des maximum d'absorption, variant de 9 nm (340 nm à $Tr = 18,70$ min, et 349 nm à $Tr = 18,90$ min). Ces observations posent l'hypothèse de deux molécules proches ou de deux isomères correspondant à ce massif. Le massif a été récupéré pour une analyse RMN 1H et ^{13}C .

3. Analyse par spectrométrie de masse

a) Analyse par HPLC/MS de l'extrait total

L'extrait total a été analysé par HPLC/MS. un massif correspondant à celui observé lors du micro fractionnement a été visualisé, pour un temps de rétention de 18,7 min. Le spectre de masse présenté dans la figure 22, dans lequel deux pics de rapport m/z se démarquent en mode négatif. Le premier pic a un rapport m/z de 308,91, le deuxième pic a quant-à-lui un rapport m/z de 344,95 (Figure 20, p 26 ter).

b) Analyse par infusion en spectrométrie de masse du massif isolé

Ce massif analysé par infusion résultant de la séparation par micro fractionnement de l'extrait cyclohexane contient majoritairement les masses m/z 385,9, 341,7 et 309. La masse 341,7 retrouvée en mode négatif semble correspondre à la suppression de deux adduit sodium sur la masse 385,9 soit deux fois 23. La fragmentation MS2 respective de 385,9 et 341,7 aboutit à la formation de fragments identiques : $m/z = 293,8$, 282,8, et 238,8 comme montrés dans le Tableau XXII. La transition de 341,7 à 293,8, correspond à une perte d'une masse de 47 qui pourrait correspondre à CH_3S . La masse 309, observée au début, pourrait correspondre à un fragment des deux autres 385,9 et 341,7. En effet, la fragmentation MS2, de cette masse donne des fragments de masses proches de ceux observés pour 385,9 et 341,7 ($m/z = 293,8$, 278, 9, 234, 8). La transition de 309 à 293,8 pourrait correspondre à la perte de CH_3S (Tableau XXII, p26 quat).

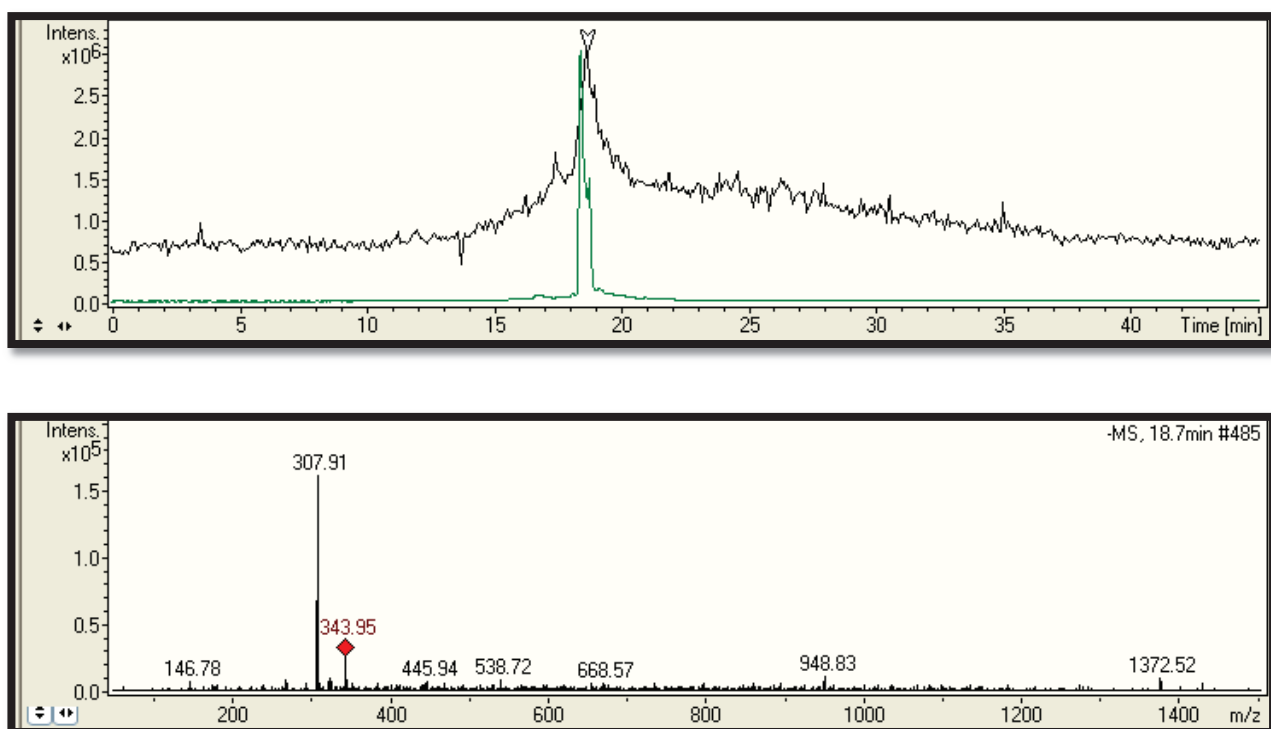


Figure 20: Résultats de la spectrométrie de masse sur l'extrait cyclohexane total, en haut le profil de séparation par chromatographie liquide à 360nm en vert couplé au profil de la masse en noir. En bas le spectre masse obtenu pour le maximum d'intensité. (en mode négatif)

Tableau XXII: Résultats des spectromètres de masse, de la perfusion de la fraction cyclohexane isolé.

Fraction G5			
[M+ H] m/z	Fractionnement MS2	[M+H] m/z	Fractionnement MS2
385.9	341.7	613.3	
	297.8	582.9	
	238.9	331.1	316.1
	282.8		287
341.7	297.8	304.1	686.4
	282.8		286
	267.8		240
	238.8		211.22
	210.8		163.1
309	293.8		132.1
	278.9		90.4
	263.8		668.9
	234.8	274.1	406.6
			256
			226
			163.1

Tableau XXIII: Fractions récupérées issu de l'HPLC préparative.

Fractions	Temps de rétention	Masse d'extrait (en mg)
H1	3 à 4.5 min	2.8
E6	21.5 à 23 min	8.8
H7	27 à 28 min	2.7

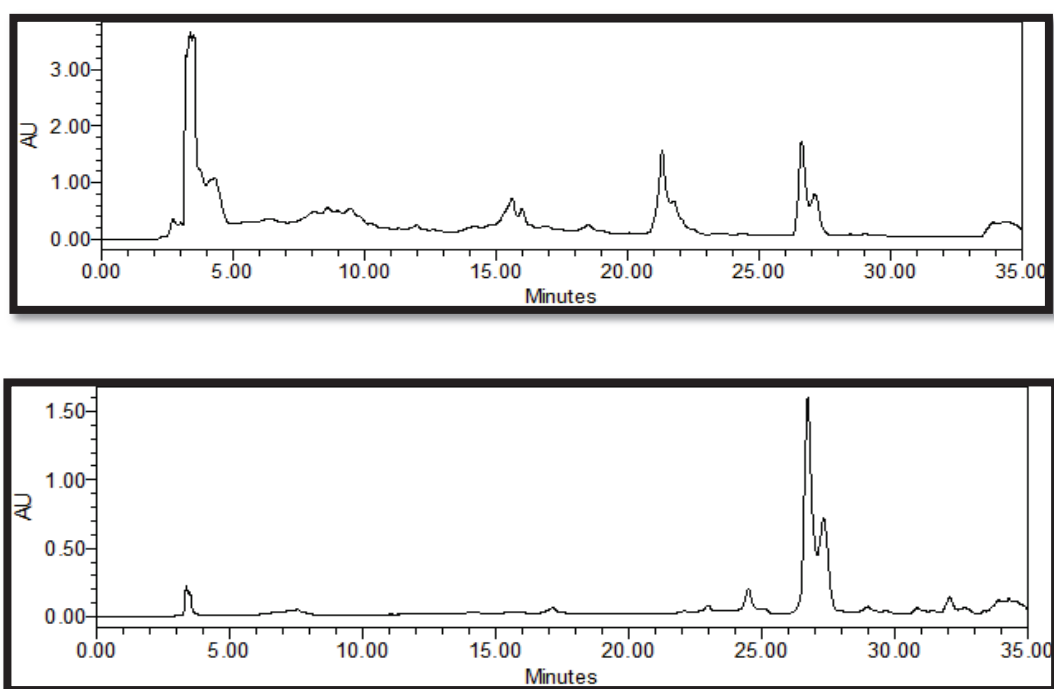


Figure 21: Profil HPLC de l'extrait acétate d'éthyle sur lequel l'HPLC préparative a été réalisé, au dessus le profil à 254 nm, en dessous le profil à 360 nm.

Cette analyse montre des valeurs de m/z similaires à ceux décrits pour la dehydroxybisdethiobis(methylthio)gliotoxine de masse $[M^+]$ de 340 en LR-EI-MS (323, 309, 293, 265) précédemment décrite chez *Pseudallescheria sp.* (Li *et al.* 2006). Par contre les masses des autres fragments diffèrent d'une masse 8 de ceux décrits pour la dehydroxybisdethiobis(methylthio)gliotoxine.

D. Purification des métabolites à activité antibactérienne de l'extrait Acétate d'éthyle

1. HPLC analytique

Le gradient utilisé, figurant dans le tableau VII était adapté à l'extrait puisque qu'il a permis d'obtenir un profil HPLC exploitable.

Lors de l'analyse par HPLC, en comparant les résultats obtenus pour l'extrait provenant du surnageant de culture fongique à celui du milieu, il a été noté que le milieu absorbé peu, un seul pic est visible à 254 et 280min avec une intensité de inférieur à 100mAU pour un temps de rétention de 4.90min.

2. Micro fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle pour isoler la ou les molécules à activité antibactérienne

Le but de cette analyse était d'isoler les pics obtenu sur le profil HPLC, de manière à identifier la fraction active. Pour cela une séparation fine a été réalisée en effectuant des fractions par intervalles de 30secondes, les profils HPLC complets sont présentés dans la Figure 21 (p 27 bis). Les fractions obtenues ont été analysées par HPLC avant d'être regroupées (Tableau XIII, p 27 bis).

Une forte similitude est observée entre le profil de l'extrait dichlorométhane (Figure 17) et celui de l'extrait acétate d'éthyle (Figure 21 21, p 27 bis). Les temps de rétentions ainsi que les chromatogrammes des différents pics présentent de fortes homologues qui font suspecter la présence des mêmes molécules au sein des deux extraits. De plus ils présentent le même profil en spectrométrie de masse.

Discussion et perspectives

La recherche de nouveaux antibiotiques est un enjeu majeur pour la prise en charge des infections à germes multi résistants comme *S. aureus* et *P. aeruginosa*, responsables de nombreuses infections. Ce stage s'est inscrit dans ce contexte, et s'est articulé autour de trois axes bien définis :

- la validation de l'antagonisme entre *Pseudomonas aeruginosa* et les espèces du complexe *Scedosporium*.
- l'étude des spectres d'activités des métabolites produits.
- la purification et la caractérisation des métabolites à activité antimicrobienne par *P.aeruginosa* et *Scedosporium*.

I. Premier axe de recherche : la validation de l'antagonisme entre *Pseudomonas aeruginosa* et les espèces du complexe *Scedosporium*

L'antagonisme observé dans la mucoviscidose entre *Pseudomonas aeruginosa* et les espèces de *Scedosporium* a été recherché *in vitro*. Des expériences préliminaires réalisées au laboratoire avaient montré, dans le cas d'une co-culture entre *P. aeruginosa* et *Pseudallescheria boydii* 4595, un antagonisme entre ces deux souches.

Ces expériences de co-culture ont été à nouveau réalisées dans le cadre d'un stage de première année de master en fin d'année 2013, puis lors de ce stage, sans qu'aucun antagonisme ne soit observé. Ces résultats ne sont pas en adéquation avec ceux qui ont initiés l'étude. Cette absence d'antagonisme a été validée plusieurs fois, malgré l'utilisation à l'identique du protocole, établi préalablement.

Cette différence de résultat peut être expliquée par plusieurs hypothèses. L'une des premières hypothèses est que ni la bactérie et ni le champignon n'ont, dans ces conditions de culture, synthétisé de métabolites à activité antimicrobienne. La deuxième hypothèse est que la synthèse des métabolites à activité antimicrobienne se fait dans des conditions de culture particulières, qui ne sont pas maîtrisées, ou qui sont retrouvées uniquement chez le malade. La troisième hypothèse est qu'il y ait eu une erreur lors de la précédente manipulation, comme par exemple l'utilisation de chloramphénicol dans le milieu de culture. En effet, le chloramphénicol est couramment utilisé dans les milieux de culture dans le laboratoire.

Cependant, il est bien observé chez les patients infectés par *P. aeruginosa*, une prévalence pour les infections à *Scedosporium* plus faible que chez les patients non infectés. Et de même chez les patients colonisés/infectés par *Scedosporium*, une prévalence pour les infections à *P.aeruginosa* plus faible que chez les patients qui ne le sont pas. Il semble donc bien exister un antagonisme entre ces deux espèces. Mais l'antagonisme pourrait être dû à d'autres facteurs que la synthèse de métabolites antimicrobiens à la fois par la bactérie et le champignon. Cet axe demande encore à être étudié afin d'expliquer l'observation clinique qui a été faite et l'exploiter. Il serait nécessaire d'identifier par

exemple les conditions de cultures nécessaires à la mise en évidence de cet antagonisme, ou bien les mécanismes *in vivo* responsable de cet antagonisme.

Des expériences ont été menées sur le surnageant de culture de *P. aeruginosa* afin de voir si la bactérie excréta dans le milieu extérieur des métabolites à activités antifongiques capable d'inhiber la croissance de *Scedosporium*. *P. aeruginosa* est capable de synthétiser des métabolites de nature diverses doués d'une activité antifongique (phénazines, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le DAPG), mais dans nos conditions aucune inhibition de la croissance fongique par le surnageant bactérien n'a été mise en évidence. L'absence d'activité du surnageant sur différentes souches fongiques (*P. boydii* 4595, *P. boydii* n°4, *P. minuspora* n°4, *S. prolificans* 805 656 41 13 et *A. fumigatus* CBS 113 26 1413) peut être due à l'absence de synthèse de métabolites antimicrobiens dans les conditions de culture. Il faudrait étudier différentes conditions de cultures et rechercher une activité fongique dans le surnageant de culture.

L'absence d'activité antifongique du surnageant de culture bactérien peut diriger les recherches vers le lysat de la culture bactérienne, comme cela a été réalisé chez *E. coli* (Balhara *et al.* 2014)

II. Deuxième axe d'étude : Mise en évidence de l'inhibition de la croissance bactérienne par le surnageant de culture de *P. boydii* 4595 et étude du spectre d'activité

Des expériences préliminaires réalisées au laboratoire avaient montré l'inhibition de la croissance de *P. aeruginosa* par le surnageant de culture de *Pseudallescheria boydii* 4595.

Les résultats des expériences réalisées tout au long de ce stage ont montré une incohérence avec ceux précédents. Une activité antibactérienne du surnageant de culture de *P. boydii* 4595 a été montrée sur les *Staphylococcus* avec des diamètres de zone d'inhibition de la croissance comprise entre 16 et 40 mm pour *Staphylococcus aureus*, et de 16 à 48 mm pour *Staphylococcus epidermidis*. Cette activité antimicrobienne a été observée également pour des souches de *Staphylococcus* présentant des résistances aux antibiotiques avec des diamètres compris entre 16 et 25 mm. Précédemment, il a été démontré que les surnageants de culture de *P. boydii* 4595 étaient aussi capables d'inhiber la croissance de *Streptococcus agalactiae* avec un diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne de 17 mm (Breuil 2014). L'inhibition de la croissance de *P. aeruginosa* a été visible et mesurable (20 mm) de manière franche qu'une seule fois. Il faut noter que sur certains antibiogrammes, une zone de culture moins dense était observée à proximité du disque d'antibiogramme.

Ces résultats ont permis de réorienter l'axe de recherche vers l'étude de l'activité du surnageant de culture de *P. boydii* 4595 sur la croissance des cocci gram + et notamment, sur les *Staphylococcus*.

Différentes conditions de culture ont été testées et ont permis d'identifier parmi les conditions évaluées, celle pour laquelle l'activité antibactérienne du surnageant de culture de *Scedosporium* donnait des valeurs d'inhibition plus élevée. La culture en milieu liquide doit donc se faire par volume de 200mL à 37°C, avec une concentration en spores initiales de 5×10^6 spores/mL. Devant la variété des résultats obtenus au cours de l'étude, il a été supposé que la synthèse de métabolites à activité antibactérienne pouvait être variable. En effet, malgré des conditions de culture identiques, les diamètres observés étaient différents. Cette synthèse dépend de facteurs environnementaux ou autres non contrôlés. Des expériences complémentaires pourraient être effectuées afin d'identifier le temps d'incubation pour lequel l'activité antibactérienne est la plus forte (5j, 7j, 10j, 14j). D'autres conditions pourraient être aussi testées comme le pH, l'incubation sous atmosphère enrichie en CO₂, et des conditions simulant celles retrouvées chez les patients atteints de mucoviscidose.

III. Troisième axe : Purification et caractérisation de la ou des molécules à activité antibactérienne.

L'étude a été poursuivie afin de purifier et caractériser la ou les molécules à activité antibactérienne vis-à-vis des *Staphylococcus*, produit par *P. boydii* 4595. L'activité antibactérienne anti *Staphylococcus* a été observée dans les extraits cyclohexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle. Cette observation, permet d'émettre deux hypothèses. La première hypothèse est qu'il existe plusieurs molécules et la seconde hypothèse est qu'une seule molécule pourrait être solubilisée dans les trois solvants.

Lors des différentes extractions, un faible rendement d'extrait a été obtenu pour les extraits cyclohexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle, ce qui a réduit le champ d'expertise. Cela a été d'autant plus vrai après la séparation des molécules par HPLC semi préparative. Les rendements les plus importants ont été obtenu pour les extraits butanoliques et aqueux. Dans ces deux extraits, les sucres ont été solubilisés.

Ce problème pourrait être résolu en réalisant des cultures en fermenteur, qui permettrait la réalisation de culture en grand volume ($\geq 10L$). De plus les conditions de culture devraient être optimisées afin de pouvoir produire en quantité la ou les métabolites à activités antibactériennes.

Un fractionnement par HPLC a permis d'identifier la zone d'élution dans laquelle se situait l'activité. Elle a été observée dans la zone moyennement polaire. Un micro fractionnement a permis une séparation des molécules, observables en UV, pour les trois extraits. Les molécules correspondant aux zones d'élution responsables de l'activité antimicrobienne ont été analysées en priorité.

L'analyse de la fraction isolée dans l'extrait cyclohexane par spectrométrie de masse a permis une première orientation, vers un dérivé de la gliotoxine : le dehydroxybisdethio-

bis(méthylthio)gliotoxine. En effet, les profils UV et les fragments en MS2 similaires à ceux de ce dérivé ont été observés. Cette observation est logique puisqu'en 2006, il a été démontré qu'une souche de *P. boydii* isolée d'une algue marine possédait une activité antibactérienne vis-à-vis des *Staphylococcus* méthicilline résistant voir multirésistant. Cette activité a été imputée à ces dérivés de la gliotoxine : le dehydroxybisdethio-bis(méthylthio)gliotoxine et le bisdethiobis(méthylthio)-gliotoxine. L'identification de cette molécule nécessite une analyse de la Résonance Magnétique Nucléaire (^1H , ^{13}C , et 2 dimension). Cette analyse permettra de se rapprocher de la structure des molécules.

L'analyse de deux fractions isolées de l'extrait dichlorométhane, n'a pas encore permis d'orienter l'identification. Les analyses sont actuellement en cours pour identifier les molécules isolées.

De la même façon, l'analyse de deux fractions isolées de l'extrait dichlorométhane, par RMN (^1H , ^{13}C) sont actuellement en cours. Pour ces deux fractions les premiers résultats donnent une ressemblance au niveau du ^1H , mais les masses sont différentes, il s'agirait de molécules proches.

Le micro fractionnement a permis de séparer les différents pics obtenus, par la suite il sera possible d'identifier les molécules correspondant à chacun des pics en analysant leur spectre de masse et le résultat des RMN, permettant ainsi peut être l'identification de nouvelles molécules par *P. boydii*.

Lors des analyses, il a été observé que les profils HPLC/UV des extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle présentaient de nombreuses similarités. Les chromatogrammes des pics isolés et les masses sont eux aussi du même ordre de grandeur. De plus ces deux extraits présentent une activité antibactérienne vis-à-vis des *Staphylococcus*. Ces deux aspects permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle les mêmes molécules ou des dérivés, seraient extrait de manière préférentielle dans certains solvants. Au vu de cette supposition, il serait adéquat dans le futur d'éliminer les extractions par le dichlorométhane mais de conserver l'extraction par le cyclohexane et l'acétate d'éthyle. Ce protocole permettrait un enrichissement en métabolites, ainsi que leurs identifications.

La perte de l'activité antibactérienne sur *Staphylococcus epidermidis* des extraits, alors qu'elle a été observée de façon constante avec le surnageant de culture de *P. boydii*, peut s'expliquer par la nécessité d'une certaine concentration de la molécule ou d'une synergie de molécules séparées lors de l'extraction.

Après l'identification de ses molécules et notamment de celle(s) douée(s) d'une activité antibactérienne, une étude pourra être menée sur les mécanismes d'actions de la ou des molécules à activité antibactérienne et sur l'identification de manière précise du spectre d'activité. Ces molécules pourraient par la suite faire l'objet d'étude de toxicités, à des fins thérapeutiques. Il pourrait aussi être intéressant d'étudier la perte d'activité des extraits sur *S. epidermidis*.

Ces molécules pourraient être par la suite utilisées pour traiter les infections à *Staphylococcus*, notamment les infections provoquées par des souches résistantes voire multirésistantes.

Bibliographie

- Alanio, A. 2013. "La Spectrométrie de Masse de Type MALDI-TOF En Mycologie Clinique : Avantages Réels, Écueils Potentiels." *Journal Des Anti-Infectieux* **15** (2): 71–82. doi:10.1016/j.antinf.2013.04.001.
- Amandine Rougeron. 2013. "Distribution Dans La Mucoviscidose et Écologie Des Différentes Espèces Du Complexe *Scedosporium Apiospermum*". Ecole Doctorale Biologie santé, Université Nantes Angers. Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes p193
- Balhara, Meenakshi, Sonam Ruhil, Manish Kumar, Sandeep Dhankhar, and A K Chhillar. 2014. "An Anti-Aspergillus Protein from *Escherichia Coli* DH5 α : Putative Inhibitor of Siderophore Biosynthesis in *Aspergillus Fumigatus*." *Mycoses* **57** (3): 153–62. doi:10.1111/myc.12119.
- Bernhardt, A., L. Sedlacek, S. Wagner, C. Schwarz, B. Würstl, and K. Tintelnot. 2013. "Multilocus Sequence Typing of *Scedosporium Apiospermum* and *Pseudallescheria Boydii* Isolates from Cystic Fibrosis Patients." *Journal of Cystic Fibrosis* **12** (6): 592–98. doi:10.1016/j.jcf.2013.05.007.
- Blyth, Christopher C, Peter G Middleton, Azian Harun, Tania C Sorrell, Wieland Meyer, and Sharon C-A Chen. 2010. "Clinical Associations and Prevalence of *Scedosporium* Spp. in Australian Cystic Fibrosis Patients: Identification of Novel Risk Factors?" *Medical Mycology* **48** Suppl 1 (November): S37–44. doi:10.3109/13693786.2010.500627.
- BOURAHLA Amine. "Etude Métabolomique de *Scedosporium Apiospermum*, Champignon Pathogène de L'homme, Dans Le Contexte de La Mucoviscidose." Mémoire de stage
- Boyle, Michael P, and Kris De Boeck. 2013. "A New Era in the Treatment of Cystic Fibrosis: Correction of the Underlying CFTR Defect." *The Lancet Respiratory Medicine* **1** (2): 158–63. doi:10.1016/S2213-2600(12)70057-7.
- Breuil Alexandre. "Antagonisme Entre Les Espèces Du Complexe *Scedosporium Apiospermum* et *Pseudomonas Aeruginosa* Chez Les Patients Atteints de Mucoviscidose." Mémoire de stage
- Campodónico, Victoria L., Mihaela Gadjeva, Catherine Paradis-Bleau, Ahmet Uluer, and Gerald B. Pier. 2008. "Airway Epithelial Control of *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis." *Trends in Molecular Medicine* **14** (3): 120–33. doi:10.1016/j.molmed.2008.01.002.
- Cant, Natasha, Naomi Pollock, and Robert C. Ford. 2014. "CFTR Structure and Cystic Fibrosis." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. doi:10.1016/j.biocel.2014.02.004. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272514000478>.
- Cerqueira, Leticia B, Thais M G de Francisco, João C Gasparetto, Francinete R Campos, and Roberto Pontarolo. 2014. "Development and Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Early Diagnosis of Aspergillosis." *PloS One* **9** (4): e92851. doi:10.1371/journal.pone.0092851.
- Chabasse, D., and J. -P. Bouchara. 1997. "Emergence de Nouveaux Champignons Pathogènes En Médecine: Revue de La Littérature." *Revue Française Des Laboratoires* 1997 **291**: 129–43. doi:10.1016/S0338-9898(97)80132-1.
- Chabasse, Dominique, Marc Pihet, and Jean-Philippe Bouchara. 2009. "Émergence de Nouveaux Champignons Pathogènes En Médecine: Revue Générale." *Revue Francophone Des Laboratoires* 2009 **416**: 71–86. doi:10.1016/S1773-035X(09)70253-9.
- Cimon, Bernard, J Carrere, J. -P. Chazalotte, J. L. Giniès, Dominique Chabasse, and Jean-Philippe Bouchara. 2014. "Mycoses Bronchopulmonaires Au Cours de La Mucoviscidose." *EM-Consulte*. Accessed June 8. <http://www.em-consulte.com/article/108164/figures/mycoses-bronchopulmonaires-au-cours-de-la-mucovisc>.
- Cimon, Bernard, Dominique Chabasse, and Jean-Philippe Bouchara. 2007. "Rôle Des Champignons Dans La Pathologie Respiratoire Au Cours de La Mucoviscidose." *Revue Francophone Des Laboratoires* 2007 **397**: 59–65. doi:10.1016/S1773-035X(07)80697-6.
- Collins, F S. 1992. "Cystic Fibrosis: Molecular Biology and Therapeutic Implications." *Science (New York, N.Y.)* **256** (5058): 774–79.

- Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. 2013. "Recommandations 2013", 60.
- Cornelis, Pierre, and Jozef Dingemans. 2013. "Pseudomonas Aeruginosa Adapts Its Iron Uptake Strategies in Function of the Type of Infections." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3 (November). doi:10.3389/fcimb.2013.00075. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3827675/>.
- Cortez, Karoll J., Emmanuel Roilides, Flavio Quiroz-Telles, Joseph Meletiadiis, Charalampos Antachopoulos, Tena Knudsen, Wendy Buchanan, *et al.* 2008. "Infections Caused by Scedosporium Spp." *Clinical Microbiology Reviews* 21 (1): 157–97. doi:10.1128/CMR.00039-07.
- "Cystic Fibrosis Mutation Database: Statistics." 2014. Accessed May 9. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>.
- Elad, Daniel. 2011. "Infections Caused by Fungi of the Scedosporium/Pseudallescheria Complex in Veterinary Species." *The Veterinary Journal* 187 (1): 33–41. doi:10.1016/j.tvjl.2010.05.028.
- "Enquête Nationale de Prévalence Des Infections Nosocomiales et Des Traitements Anti-Infectieux En Établissements de Santé, France, Mai-Juin 2012 / 2013 / Maladies Infectieuses / Rapports et Synthèses / Publications et Outils / Accueil." 2014. Accessed May 25. <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2013/Enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissements-de-sante-france-mai-juin-2012>.
- Gilgado, Felix, Josep Cano, Josepa Gené, and Josep Guarro. 2005. "Molecular Phylogeny of the Pseudallescheria Boydii Species Complex: Proposal of Two New Species." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (10): 4930–42. doi:10.1128/JCM.43.10.4930-4942.2005.
- Gilgado, Fèlix, Josep Cano, Josepa Gené, Deanna A Sutton, and Josep Guarro. 2008. "Molecular and Phenotypic Data Supporting Distinct Species Statuses for Scedosporium Apiospermum and Pseudallescheria Boydii and the Proposed New Species Scedosporium Dehoogii." *Journal of Clinical Microbiology* 46 (2): 766–71. doi:10.1128/JCM.01122-07.
- Gilgado, Fèlix, Josepa Gené, Josep Cano, and Josep Guarro. 2010. "Heterothallism in Scedosporium Apiospermum and Description of Its Teleomorph Pseudallescheria Apiosperma Sp. Nov." *Medical Mycology* 48 (1): 122–28. doi:10.3109/13693780902939695.
- Gilgado, Fèlix, Carolina Serena, Josep Cano, Josepa Gené, and Josep Guarro. 2006. "Antifungal Susceptibilities of the Species of the Pseudallescheria Boydii Complex." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (12): 4211–13. doi:10.1128/AAC.00981-06.
- Haas, Dieter, Caroline Blumer, and Christoph Keel. 2000. "Biocontrol Ability of Fluorescent Pseudomonads Genetically Dissected: Importance of Positive Feedback Regulation." *Current Opinion in Biotechnology* 11 (3): 290–97. doi:10.1016/S0958-1669(00)00098-7.
- Kaltseis, J, J Rainer, and G S De Hoog. 2009. "Ecology of Pseudallescheria and Scedosporium Species in Human-Dominated and Natural Environments and Their Distribution in Clinical Samples." *Medical Mycology* 47 (4): 398–405. doi:10.1080/13693780802585317.
- Kamigiri, Kazuma, Kouichi Tanaka, Hisao Matsumoto, Koji Nagai, Masato Watanabe, and Kenichi Suzuki. 2004. "YM-193221, a Novel Antifungal Antibiotic Produced by Pseudallescheria Ellipsoidea." *The Journal of Antibiotics* 57 (9): 569–72.
- Katsuta, Ryo, Arata Yajima, Ken Ishigami, Tomoo Nukada, and Hidenori Watanabe. 2010. "Synthesis of (2RS,8R,10R)-YM-193221 and an Improved Approach to Tyroscherin, Bioactive Natural Compounds from Pseudallescheria Sp." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74 (10): 2056–59.

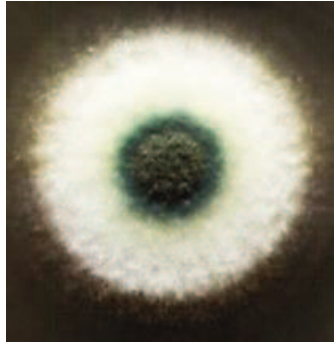
- Kipnis, E., T. Sawa, and J. Wiener-Kronish. 2006. "Targeting Mechanisms of *Pseudomonas Aeruginosa* Pathogenesis." *Médecine et Maladies Infectieuses* **36** (2): 78–91. doi:10.1016/j.medmal.2005.10.007.
- Kupfahl, Claudio, Anna Michalka, Cornelia Lass-Flörl, Guido Fischer, Gerhard Haase, Thomas Ruppert, Gernot Geginat, and Herbert Hof. 2008. "Gliotoxin Production by Clinical and Environmental *Aspergillus Fumigatus* Strains." *International Journal of Medical Microbiology* **298** (3–4): 319–27. doi:10.1016/j.ijmm.2007.04.006.
- Kuroda, K, M Yoshida, Y Uosaki, K Ando, I Kawamoto, E Oishi, H Onuma, K Yamada, and Y Matsuda. 1993. "AS-183, a Novel Inhibitor of Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase Produced by *Scedosporium* Sp. SPC-15549." *The Journal of Antibiotics* **46** (8): 1196–1202.
- Lackner, Michaela, G. Sybren de Hoog, Paul E. Verweij, Mohammad J. Najafzadeh, Ilse Curfs-Breuker, Corne H. Klaassen, and Jacques F. Meis. 2012. "Species-Specific Antifungal Susceptibility Patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* Species." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56** (5): 2635–42. doi:10.1128/AAC.05910-11.
- Li, Xifeng, Se-Kwon Kim, Ki Wan Nam, Jung Sook Kang, Hong Dae Choi, and Byeng Wha Son. 2006. "A New Antibacterial Dioxopiperazine Alkaloid Related to Gliotoxin from a Marine Isolate of the Fungus *Pseudallescheria*." *The Journal of Antibiotics* **59** (4): 248–50. doi:10.1038/ja.2006.35.
- Lima, Osana C., Gérald Larcher, Patrick Vandeputte, Anne Lebouil, Dominique Chabasse, Philippe Simoneau, and Jean-Philippe Bouchara. 2007. "Molecular Cloning and Biochemical Characterization of a Cu,Zn-Superoxide Dismutase from *Scedosporium Apiospermum*." *Microbes and Infection* **9** (5). Forum in Immunology Innate Immunity through Nod-like Receptors: 558–65. doi:10.1016/j.micinf.2007.01.027.
- Lu, Qiaoyun, A H G Gerrits van den Ende, J M J E Bakkers, Jiufeng Sun, M Lackner, M J Najafzadeh, W J G Melchers, Ruoyu Li, and G S de Hoog. 2011. "Identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* Species by Three Molecular Methods." *Journal of Clinical Microbiology* **49** (3): 960–67. doi:10.1128/JCM.01813-10.
- Lyczak, Jeffrey B, Carolyn L Cannon, and Gerald B Pier. 2000. "Establishment of *Pseudomonas Aeruginosa* Infection: Lessons from a Versatile Opportunist." *Microbes and Infection* **2** (9): 1051–60. doi:10.1016/S1286-4579(00)01259-4.
- Manwar, A. V., S. R. Khandelwal, B. L. Chaudhari, J. M. Meyer, and S. B. Chincholkar. 2004. "Siderophore Production by a Marine *Pseudomonas Aeruginosa* and Its Antagonistic Action against Phytopathogenic Fungi." *Applied Biochemistry and Biotechnology* **118** (1-3): 243–51. doi:10.1385/ABAB:118:1-3:243.
- Mehta, Anil. 2005. "CFTR: More than Just a Chloride Channel." *Pediatric Pulmonology* **39** (4): 292–98. doi:10.1002/ppul.20147.
- Mezaache, Samia. 2012. "Localisation Des Détermminants de La Suppression de Quelques Souches de *Pseudomonas* Isolées de La Rhizosphère de La Pomme de Terre." Ferhat ABBAS Sétif.
- Moreau-Marquis, Sophie, Bruce A. Stanton, and George A. O'Toole. 2008. "*Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Formation in the Cystic Fibrosis Airway." *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **21** (4). Special Section: Cystic Fibrosis Symposia: 595–99. doi:10.1016/j.pupt.2007.12.001.
- Nirma, Charlotte, Véronique Eparvier, and Didier Stien. 2013. "Antifungal Agents from *Pseudallescheria Boydii* SNB-CN73 Isolated from a *Nasutitermes* Sp. Termite." *Journal of Natural Products* **76** (5): 988–91. doi:10.1021/np4001703.
- Palma, Alejandra G, Basilio A Kotsias, and Gabriela I Marino. 2014. "[CFTR and ENaC functions in cystic fibrosis]." *Medicina* **74** (2): 133–39.

- Pavlaskova, Katerina, Jan Nedved, Marek Kuzma, Martin Zabka, Miroslav Sulc, Jan Sklenar, Petr Novak, *et al.* 2010. "Characterization of Pseudacyclins A-E, a Suite of Cyclic Peptides Produced by *Pseudallescheria Boydii*." *Journal of Natural Products* **73** (6): 1027–32. doi:10.1021/np900472c.
- "Pseurotin A • NSC 348694 (CAS 58523-30-1) || Cayman Chemical | Supplier." 2014. Accessed May 12. <https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/14441;jsessionid=01633BB01E9010E4EEC1F94ECE1134B8>.
- Rainer, J, G S de Hoog, M Wedde, Y Gräser, and S Gilges. 2000. "Molecular Variability of *Pseudallescheria Boydii*, a Neurotropic Opportunist." *Journal of Clinical Microbiology* **38** (9): 3267–73.
- "Rapport Annuel 2012 - registre_francais_de_la_mucoviscidose_2012.pdf." 2014. Accessed April 12. http://www.vaincrelamuco.org/e_upload/pdf/registre_francais_de_la_mucoviscidose_2012.pdf.
- Ratjen, Felix, and Gerd Döring. 2003. "Cystic Fibrosis." *The Lancet* **361** (9358): 681–89. doi:10.1016/S0140-6736(03)12567-6.
- Rommens, J. M. 1989. "Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping." *Trends in Genetics* **5**: 363. doi:10.1016/0168-9525(89)90154-6.
- Samuel Bertrand. 2009. "Les Sidérophore de *Scedosporium Apiospermum*: Identification, Synthèse et Applications". Ecole doctorale d'Angers.
- Sidot, C., P. Simon, J. P. Bouchara, D. Chabasse, T. Urban, and J. L. Giniès. 2007. "116 *Scedosporium Apiospermum*. Environmental Study in the Homes of Patients with Cystic Fibrosis." *Journal of Cystic Fibrosis* **6**, Supplement 1 (June). 30th European Cystic Fibrosis Conference: S29. doi:10.1016/S1569-1993(07)60106-4.
- Strausbaugh, Steven D., and Pamela B. Davis. 2007. "Cystic Fibrosis: A Review of Epidemiology and Pathobiology." *Clinics in Chest Medicine* **28** (2). Cystic Fibrosis: 279–88. doi:10.1016/j.ccm.2007.02.011.
- Su, Huey-Jen, Mei-Ju Lin, Yi-Jung Tsou, and Wen-Hsuiung Ko. 2012. "Pseudallin, a New Antibiotic Produced by the Human Pathogenic Fungus *Pseudallescheria Boydii*, with Ecological Significance." *Botanical Studies* **53**: 239–42.
- Svahn, K. Stefan, Ulf Goransson, Erja Chryssanthou, Bjorn Olsen, Jan Sjolín, and Adam A. Stromstedt. 2014. "Induction of Gliotoxin Secretion in *Aspergillus Fumigatus* by Bacteria-Associated Molecules." *Plos One* **9** (4): e93685. doi:10.1371/journal.pone.0093685.
- Varma, Ajit, and S. B. Chincholkar. 2007. *Microbial Siderophores*. Springer.

Annexes

Annexe 1 : Aspect macroscopique des souches fongiques utilisées

- *Aspergillus fumigatus*



- *Aspergillus terreus*



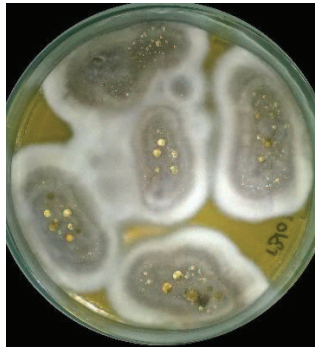
- *Exophiala epidermitidis*



- *Pseudallescheria boydii* n°4



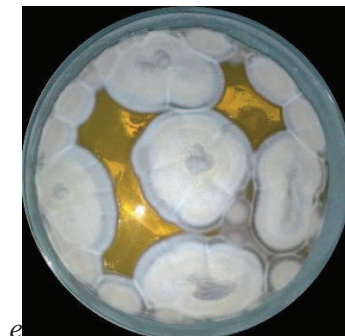
- *Pseudallescheria boydii* 4595



- *Pseudallescheria minuspora*



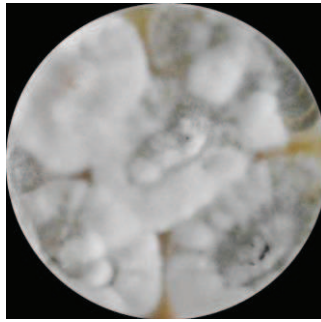
- *Rasamsonia argillacea*



- *Scedosporium apiospermum* 14 462



- *Scedosporium aurantiacum*



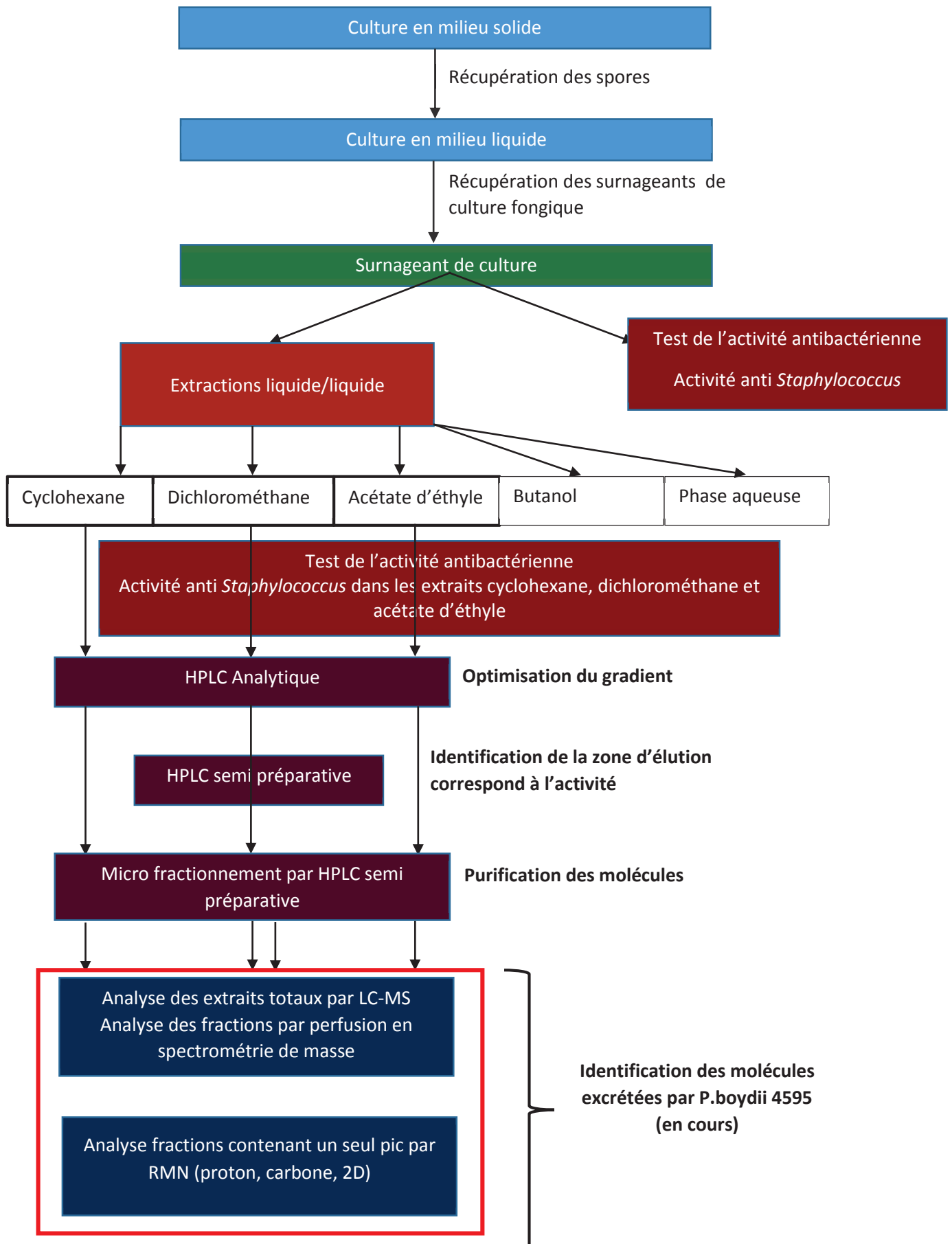
- *Scedosporium dehoogii*



- *Scedosporium prolificans*



Annexe 2 Organigramme



Résumé :

Dans le contexte de la mucoviscidose, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont responsables de nombreuses infections bactériennes de l'arbre respiratoire. Quatre vingt pourcent des patients sont colonisés/infectés par *P. aeruginosa*. D'autre part, le genre *Scedosporium* est le deuxième agent fongique filamenteux responsable des colonisations/infections pulmonaires dans la mucoviscidose.

Chez les patients atteints de mucoviscidose, un antagonisme a été démontré entre *P. aeruginosa* et les espèces du complexe *Scedosporium*, dont *Pseudallescheria boydii*. Des expériences préliminaires réalisées par le GEIHP ont permis d'observer *in vitro* cet antagonisme. Le but de cette étude était de valider cet antagonisme et d'identifier les métabolites antimicrobiens.

L'antagonisme entre ces deux souches n'a pas pu être confirmé, mais le surnageant de culture de *P. boydii* 15 155 (IHEM) a montré une activité antibactérienne dirigée contre *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis*. Une extraction a été réalisée sur le surnageant de culture, et les extraits cyclohexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle ont montré une activité antibactérienne. Les métabolites sécrétés par *P. boydii* ont été purifiés et caractérisés par HPLC couplée à la masse.

Les données d'HPLC/MS/UV de l'extrait cyclohexane montrent des similitudes avec les données analytiques de la littérature de la déhydroxybisdethiobis(méthylthio)gliotoxine, active contre les *Staphylococcus aureus*. Les analyses des autres extraits suggèrent la présence de structures chimiques originales issues de *P. boydii*.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, *Scedosporium*, *Pseudallescheria boydii*, *Staphylococcus*, Antagonisme, Activité anti *Staphylococcus*, Mucoviscidose.

Abstract :

In the context of cystic fibrosis, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are responsible for many infection of respiratory tract. Eighty percent patients are colonized/infected by *P. aeruginosa*. On the other hand, the genus *Scedosporium*, is the second filamentous fungal agent colonizing and infecting the lung of cystic fibrosis patient'.

Among patients with cystic fibrosis an antagonism have been described inter *P. aeruginosa* and the species complex *Scedosporium*, which *Pseudallescheria boydii*. This antagonism had been found previously in the GEIHP laboratory. The aim of this work has been to validate this antagonism and to identify the antimicrobial molecules.

Antagonism between these two strains could not be confirmed, but it have been demonstrated in this work that the broth of *P. boydii* 15155 (IHEM) has activity anti *Staphylococcus aureus* and *epidermidis*. An extraction has been realized in the culture broth, and the extracts cyclohexan, dichloromethane and acetate d'ethyl have been showed an antibacterial activity.

The secreted metabolite(s) by *P. boydii* have been purified and characterized by HPLC method coupled to ground.

The HPLC/MS/UV data of cyclohexan to extract show similarities with the analytical data of the literature the dehydroxybisdethiobis(methyl thio)gliotoxin, active against *Staphylococcus aureus*. Analysis of other samples suggests the presence of chemical structures original from *P. boydii*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Scedosporium*, *Pseudallescheria boydii*, *Staphylococcus*, Antagonism, activity anti *Staphylococcus*, Cystic fibrosis