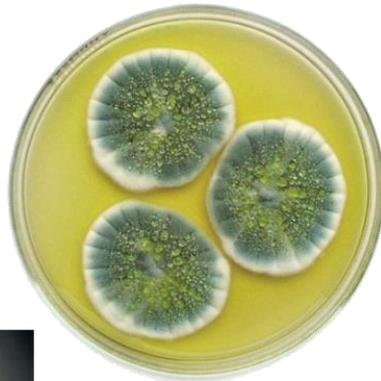
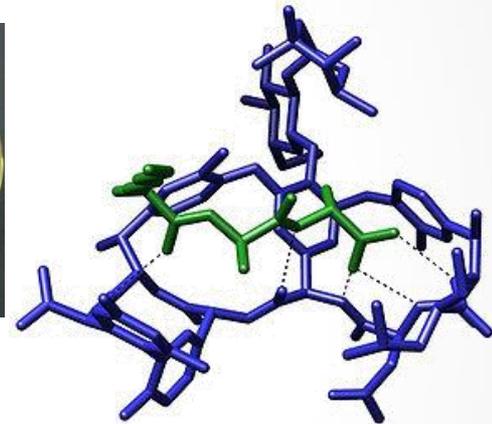
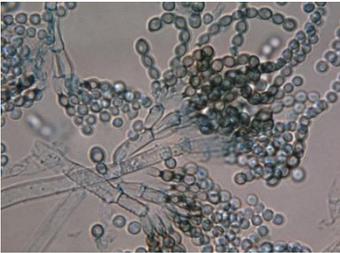


Production par des micro-organismes de petites molécules à usage thérapeutique



Mehdi BENIDDIR
mehdi.beniddir@universite
-paris-saclay.fr

Qui sont-ils ? Où vivent-ils?

Micro-organismes

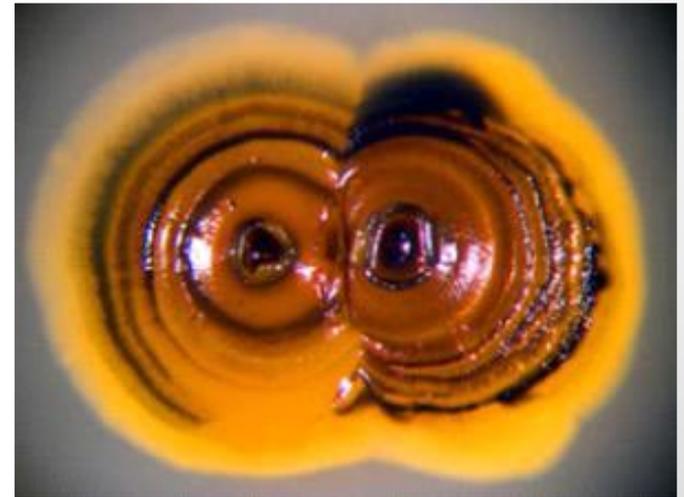
Micro-organismes terrestres-bactéries filamenteuses (actinomycètes), champignons, eubactéries (myxobactéries, cyanobactéries ..), lichen

- Existent depuis près de 3.5 milliards d'années (Homo 200 000 ans)

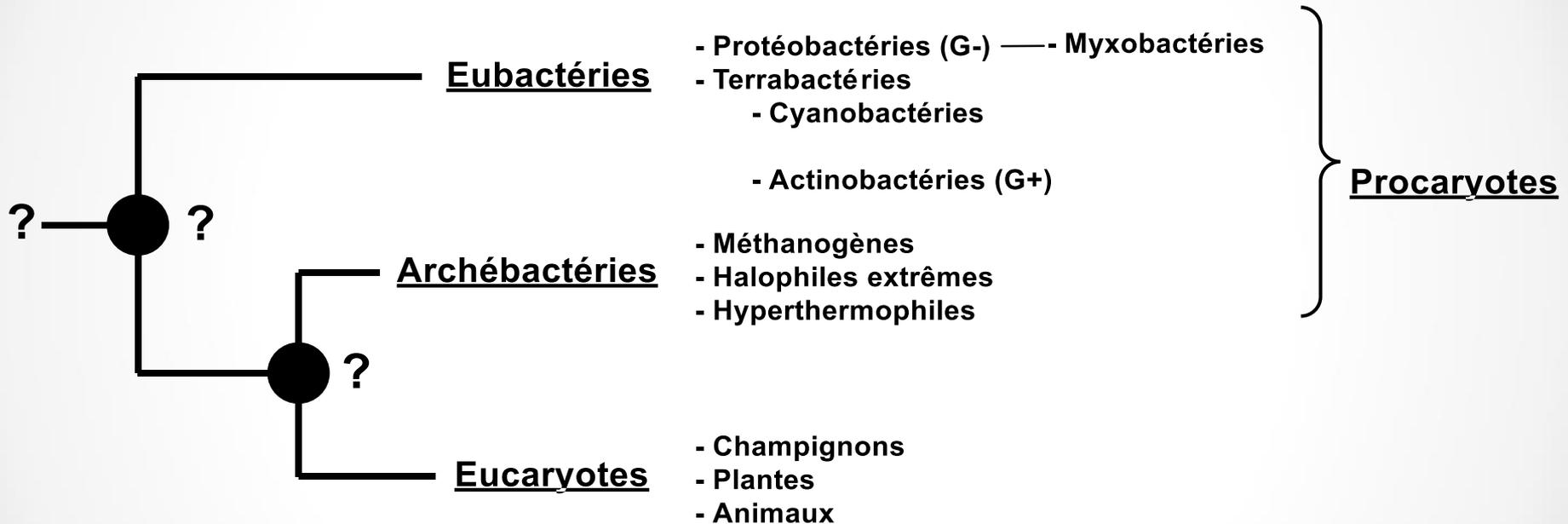
- Colonisation de tous les biotopes

- Production de squelettes chimiques hautement complexes

- 250 000 espèces décrites



ÉLÉMENTS DE CLADISTIQUE



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Eubacteria>

Qui sont-ils ? Où vivent-ils?

Nombre de molécules à activités antimicrobiennes produites

Producer organisms	Antibiotics	All bioactive	Total known
Actinobacteria	14,500	16,000	20,000–21,000
<i>Streptomyces</i> sp.	11,000	12,400	17,000
Other actinobacteria	3400	3600	4400
Eubacteriales	3500	4700	11,000–12,000
<i>Bacillus</i> sp.			1400
<i>Pseudomonas</i> sp.			950
Myxobacteriales	450	750	1200
Cyanobacteria	400	1800	4500
Other bacteria including proteobacteria, etc.	800	2000	5000
Fungi	10,500	18,000	40,000–45,000
Microscopic fungi	9000	14,000	32,000
<i>Aspergillus</i>			2200
<i>Penicillium</i>			1650
Basidiomycetes	2900	4100	9000
Other fungi including yeasts, slime moulds, etc.	110	340	3000

✓ Une centaine de ces molécules est utilisée en clinique

Température, humidité, pH, quantités de nutriments, quantités de fer...



Morphological diversity typical of microorganisms cultured from soil on a broad spectrum medium, tryptic soy agar.



Champignons
(10^4 - 10^6 /g)



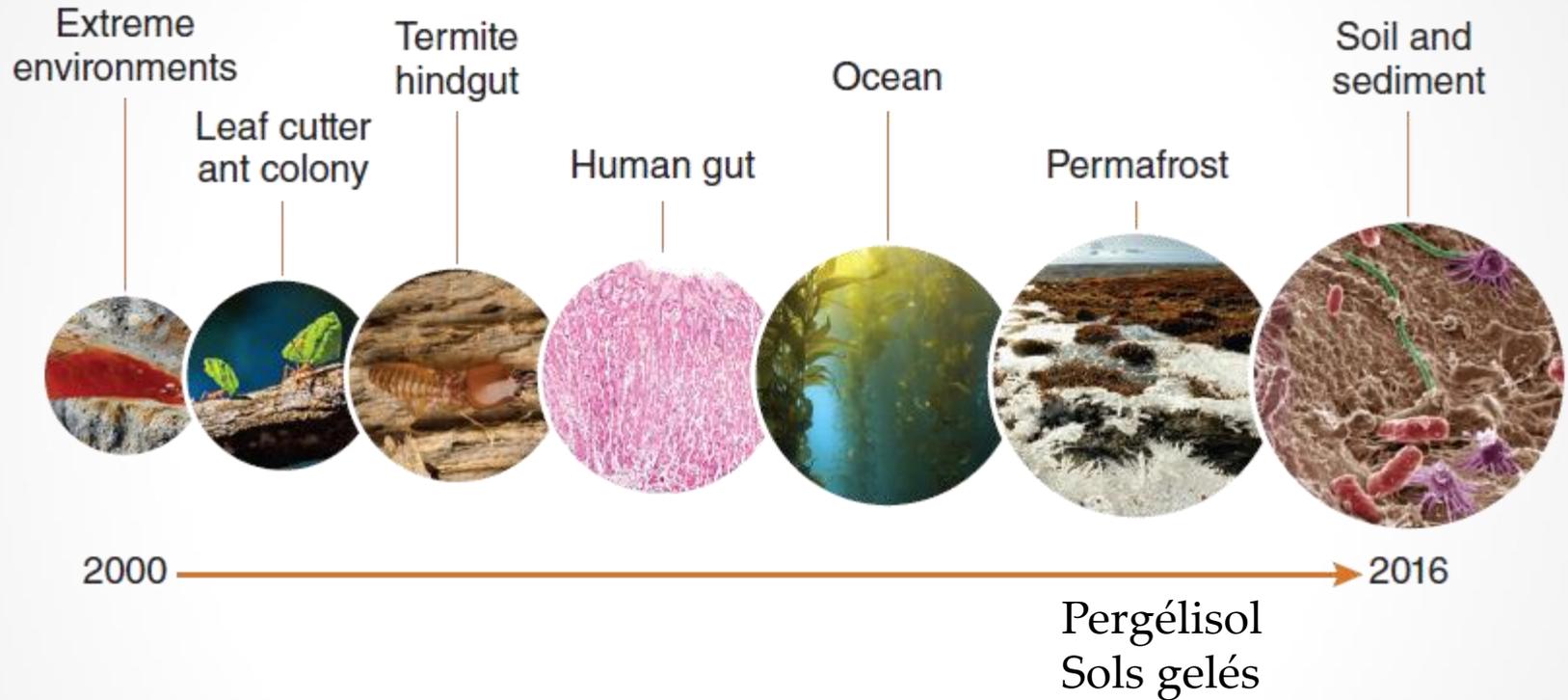
Actinomycètes
(10^6 - 10^8 /g)



Bactéries
(10^8 - 10^9 /g)

VERS DES MILIEUX TOUJOURS PLUS EXTRÊMES

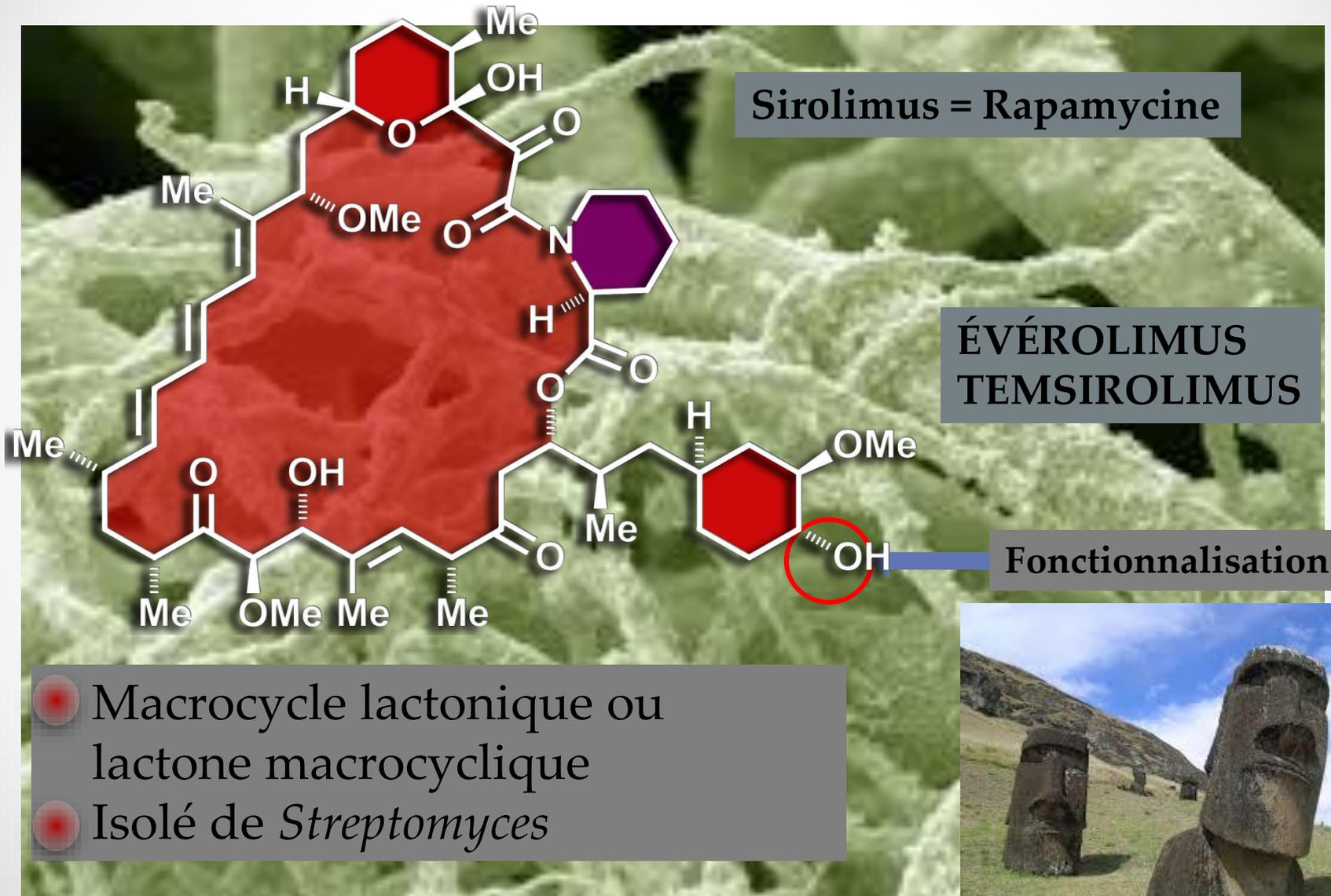
Microbiome complexity and multi-omics analysis timeline



NATURE PROTOCOLS | VOL.11 NO.11 | 2016 |

Qui sont-ils ?

Actinomycètes

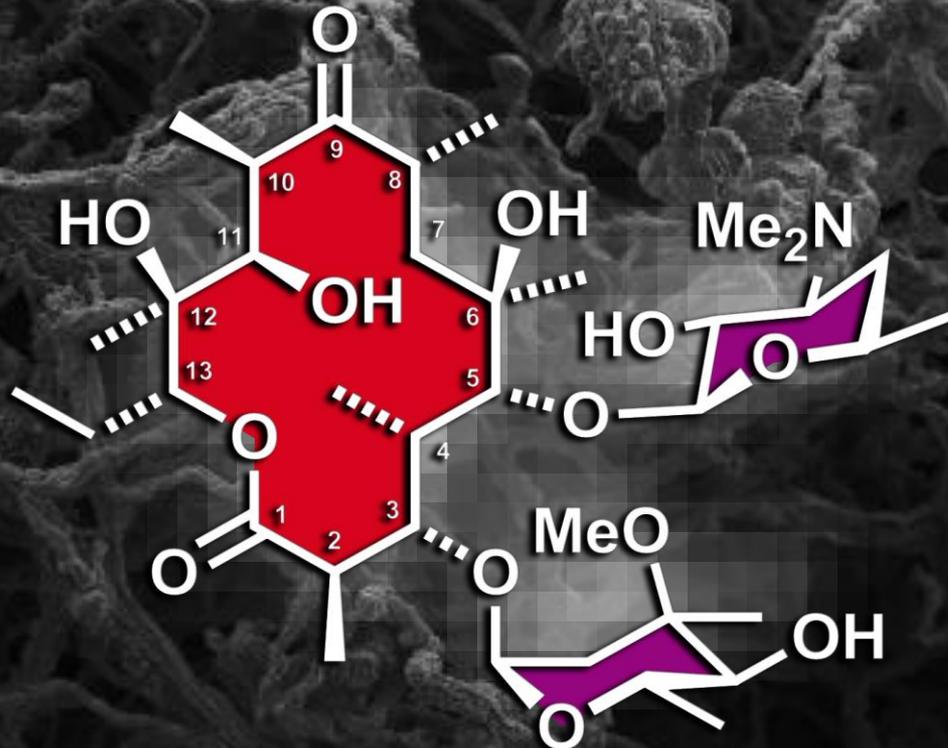


[*Streptomyces hygroscopicus*]

Actinomycètes

ÉRYTHROMYCINE : TERME GÉNÉRIQUE (CHEF DE FILE)

STRUCTURE : ÉRYTHROMYCINE A



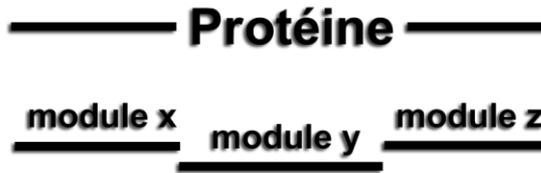
Saccharopolyspora erythraea
(ex *Streptomyces erythreus*)

BIOSYNTHÈSE

- « *POLYKETIDE SYNTHASE* » DE TYPE 1 (PKS)



PKS



COMPLEXE ENZYMATIQUE

UNITÉS FONCTIONNELLES



ENZYMES

précurseur →

précurseur →

précurseur →

**métabolite
secondaire**

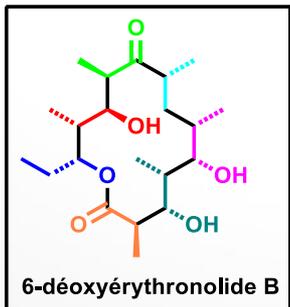
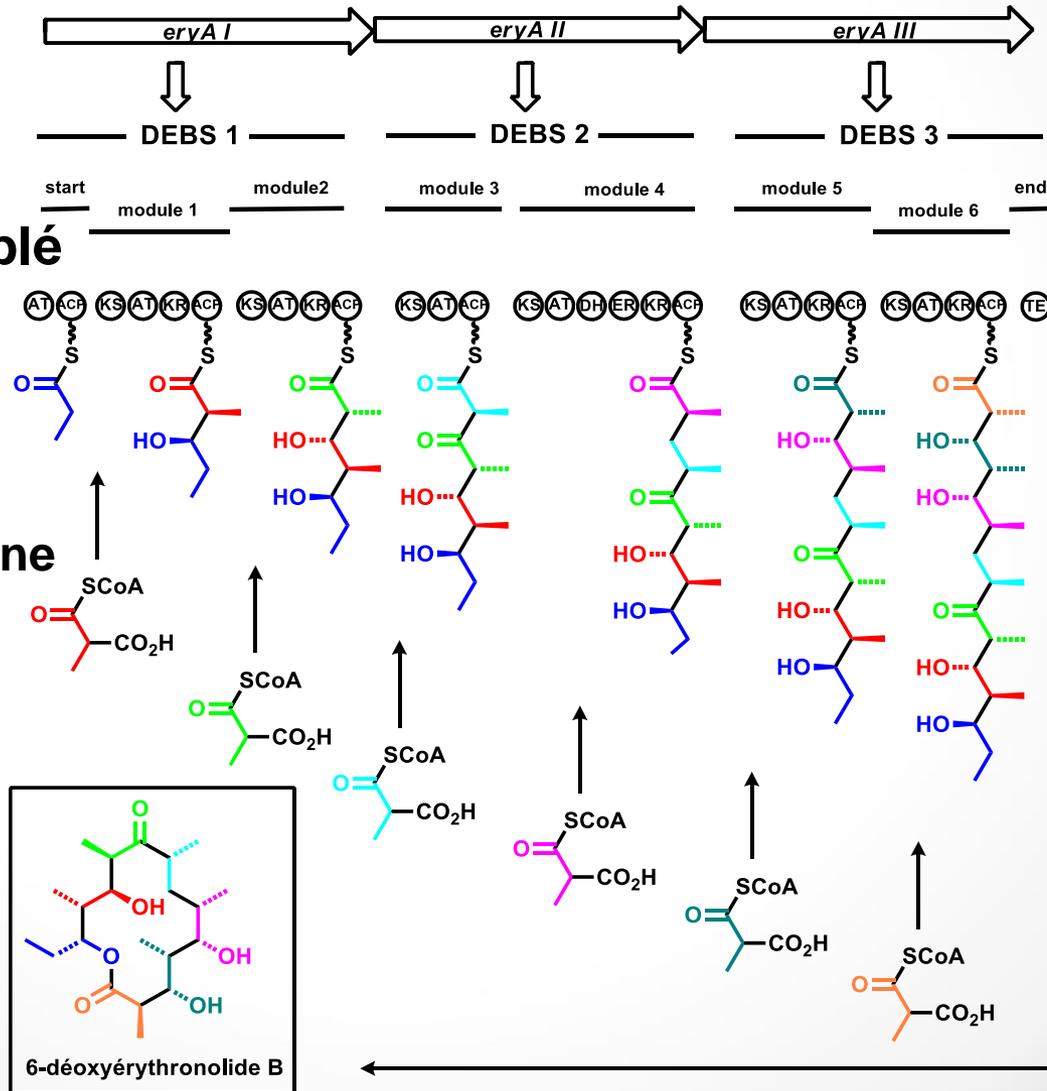
Macrolides antibactériens naturels

à 14 chaînons

• Biogenèse de l'érythromycine A

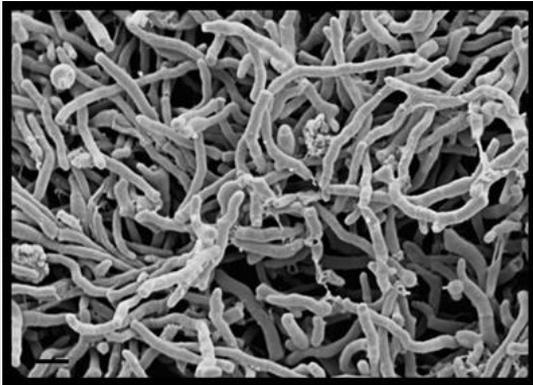
- Propionyl-CoA
- 6 x méthylmalonyl
- Polycétide assemblé par les complexes multienzymatiques type PKS

Construction de la génine
Puis fonctionalisation

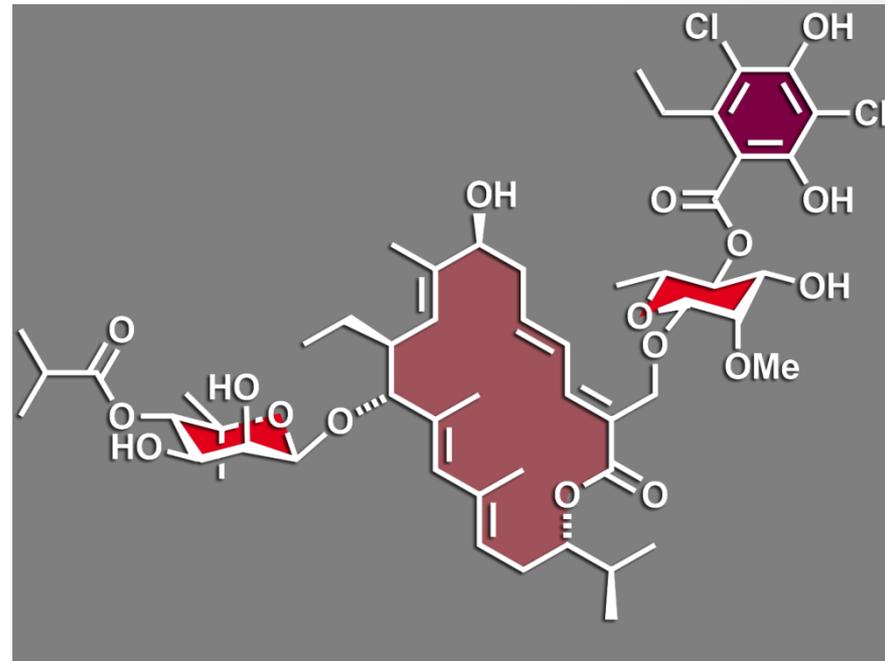


Actinomycètes

- SEUL REPRÉSENTANT À CE JOUR : FIDAXOMICINE (DCI), □, DIFICLIR®.
- INHIBITION D'ARN POLYMÉRASE
- SPECTRE ÉTROIT, TRÈS FAIBLE ABSORPTION PAR VOIE ORALE.
- UTILISATION : TRAITEMENT DES DIARRHÉES À *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ET PRÉVENTION DES RÉCIDIVES, ALTERNATIVE À LA VANCOMYCINE ORALE ET AU MÉTRONIDAZOLE.
- AMM EUROPÉENNE EN 2012, COMMERCIALISATION 2013.

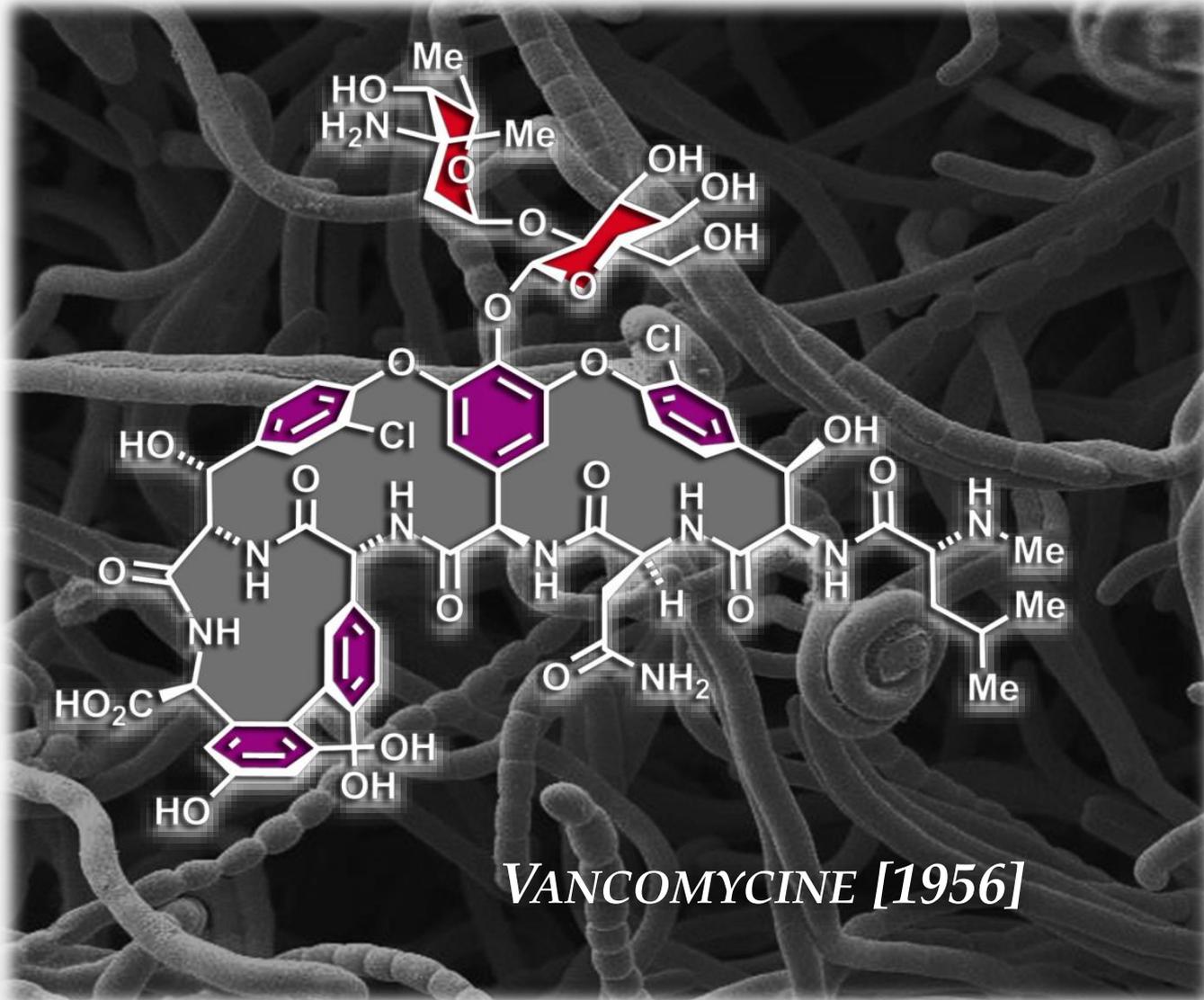


Dactylosporangium aurantiacum



Actinomycètes

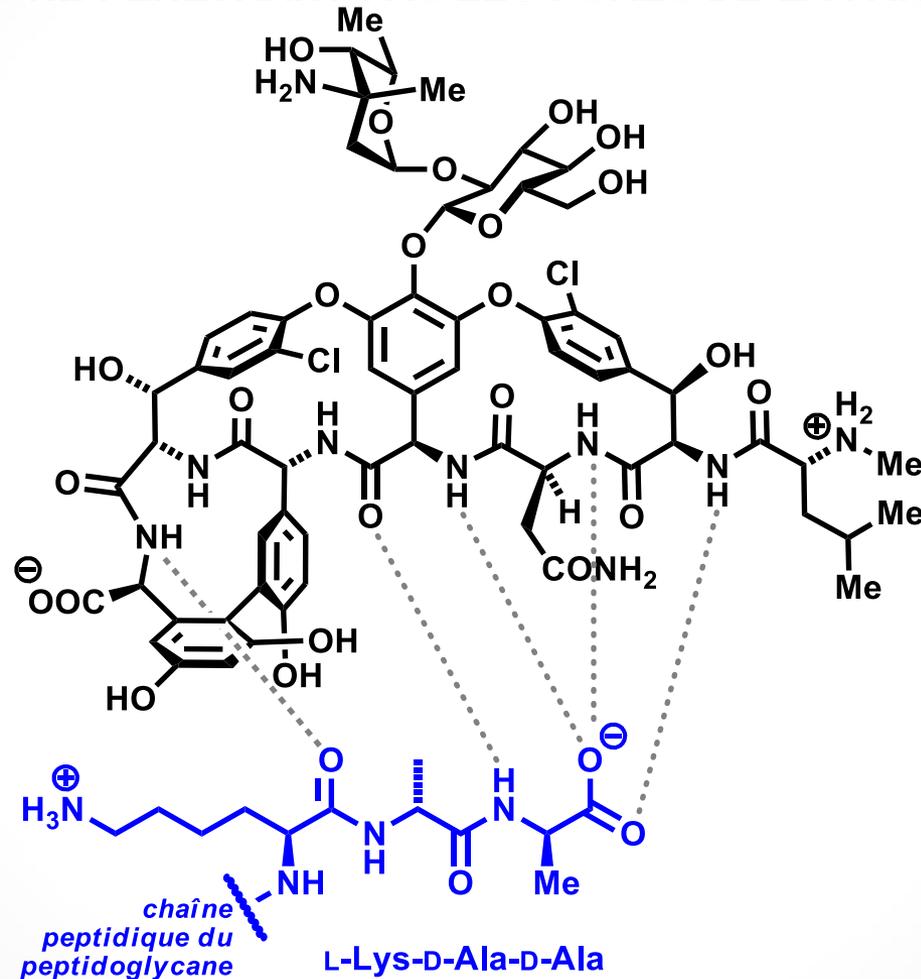
AMYCOLATOPSIS ORIENTALIS (EX STREPTOMYCES ORIENTALIS), 1956, BORNÉO
GLYCOPÉPTIDES ANTIBACTÉRIENS



Actinomycètes

- INHIBITION DE LA FORMATION DU PEPTIDOGLYCANE BACTÉRIEN.

- ANTIBACTÉRIENS NE PÉNÉTRANT PAS LES PORES DE LA PAROI DES BACTÉRIES À GRAM \ominus .



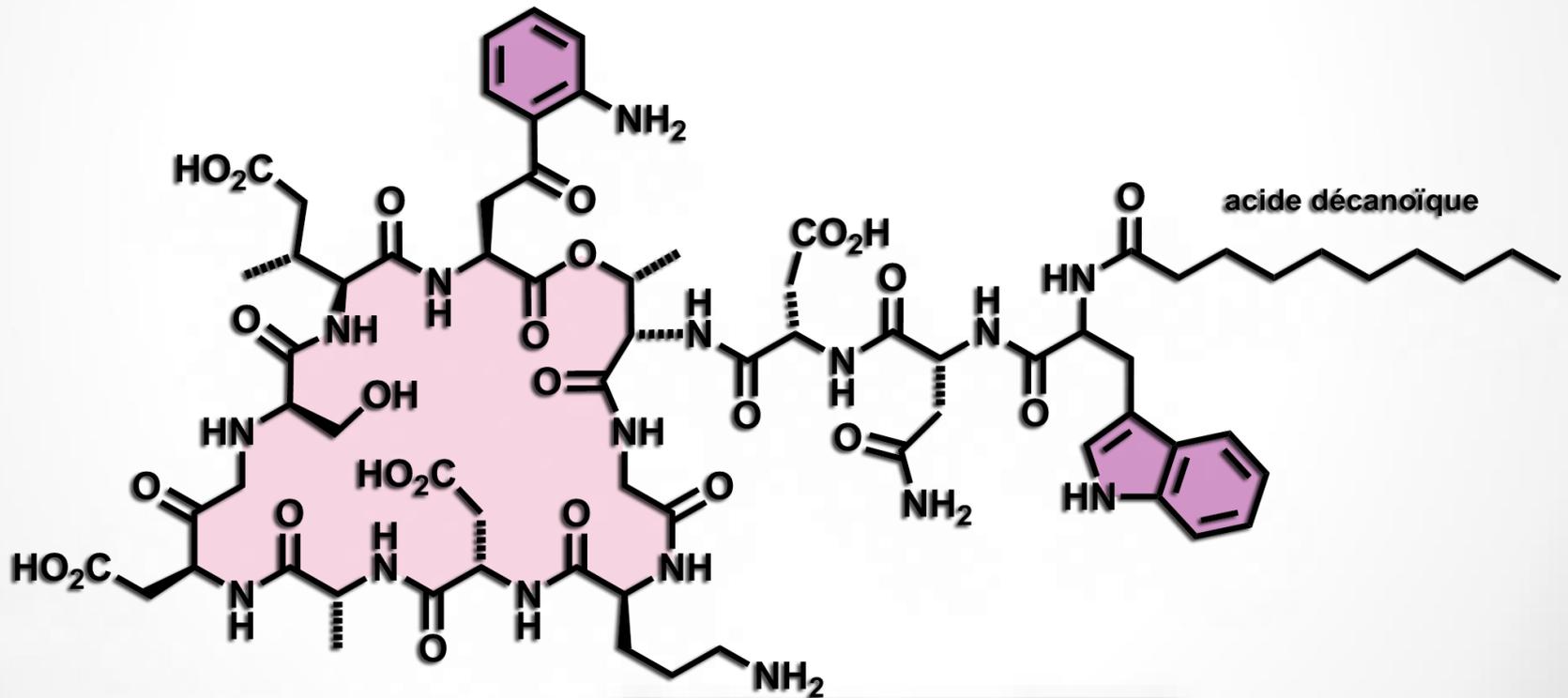
Enterococcus faecalis sensible à la vancomycine

Actinomycètes

NOUVELLE CLASSE D'ANTIBACTÉRIENS [2006].

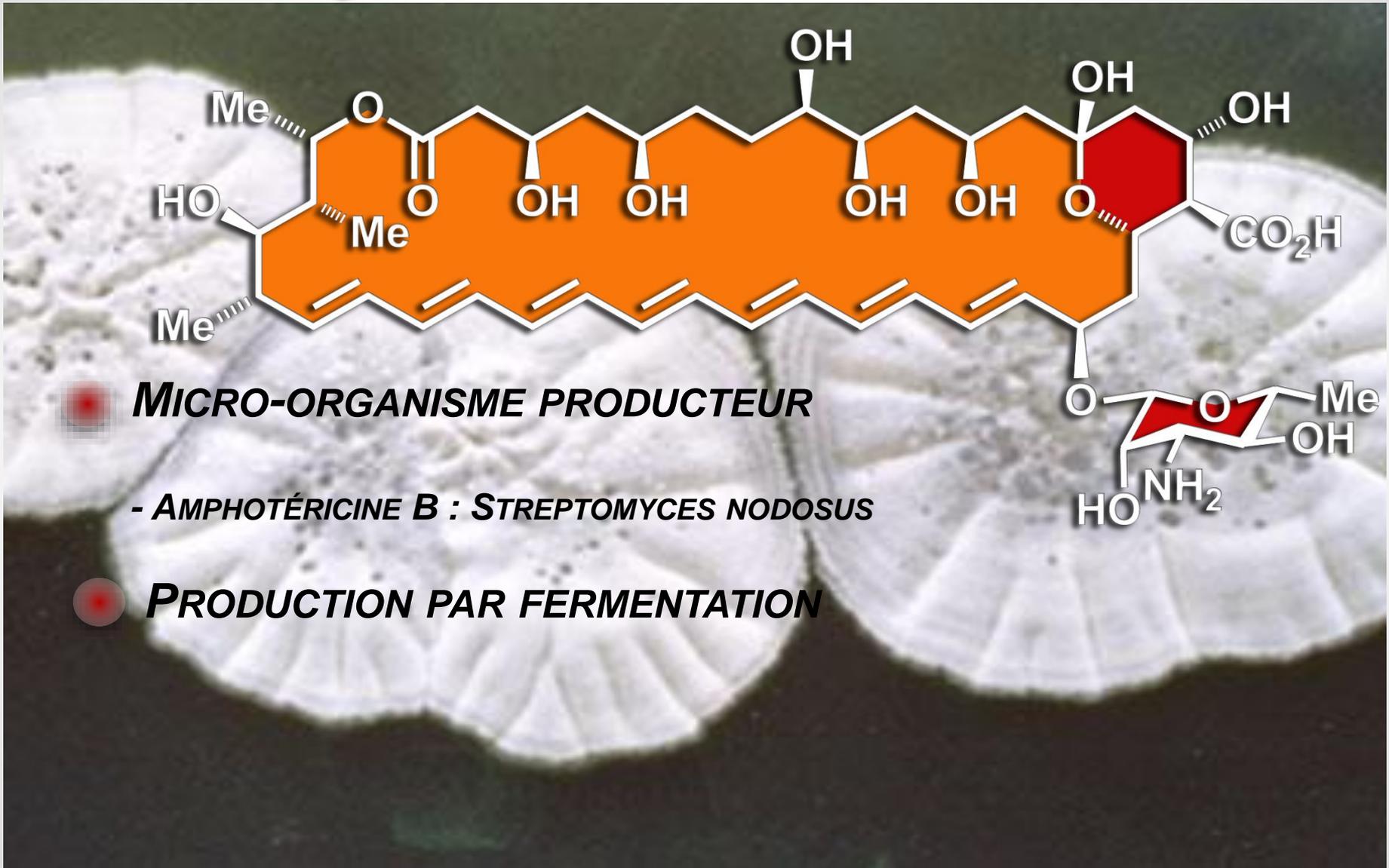
PRINCIPE ACTIF DISPONIBLE AUJOURD'HUI → DAPTOMYCINE (DCI), PRODUITE PAR STREPTOMYCES ROSEOSPORUS

LIPOPEPTIDE



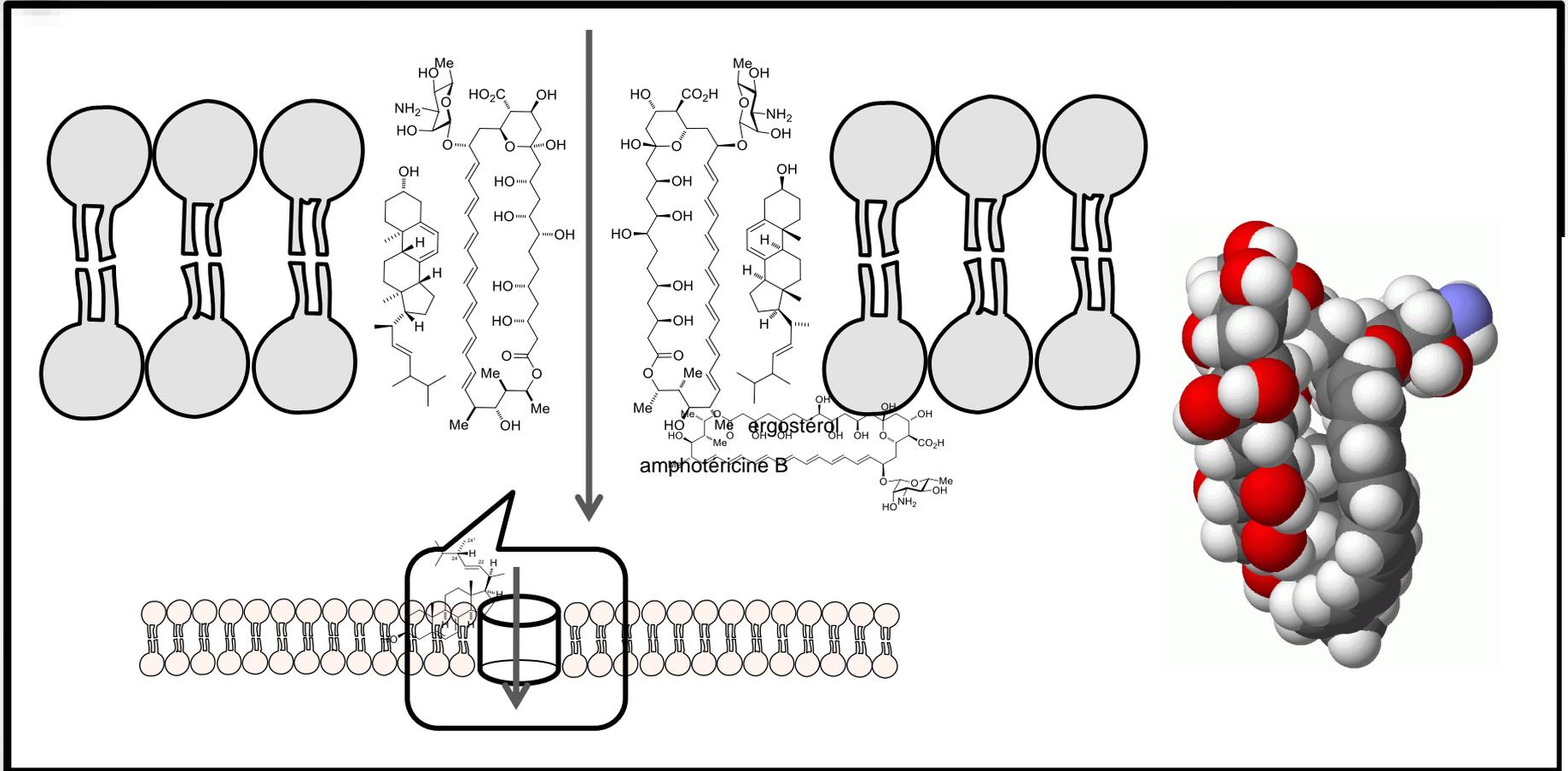
DAPTOMYCINE [2006]

Actinomycètes



MÉCANISME D'ACTION :

MÉCANISME D'ACTION DE L'AMPHOTÉRICINE B

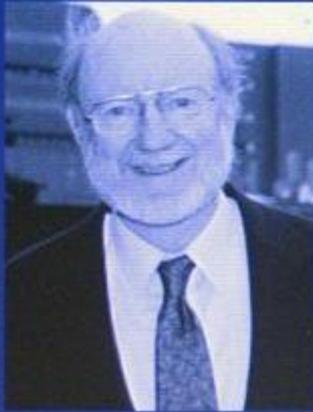


FUITE IONIQUE, EFFET FONGICIDE, LARGE SPECTRE, PEU DE RÉSISTANCE
AFFINITÉ ERGOSTÉROL >> CHOLESTÉROL

Actinomycètes



The 2015 Nobel Prize in Physiology or Medicine



William C. Campbell

Born 1930, Ireland
Drew University,
Madison, New Jersey,
USA



Satoshi Ōmura

Born 1935, Japan
Kitasato University,
Tokyo, Japan



Youyou Tu

Born 1930, China
China Academy of
Traditional Chinese
Medicine, Beijing, China

Actinomycètes

LES AVERMECTINES, UN DON DU SOL

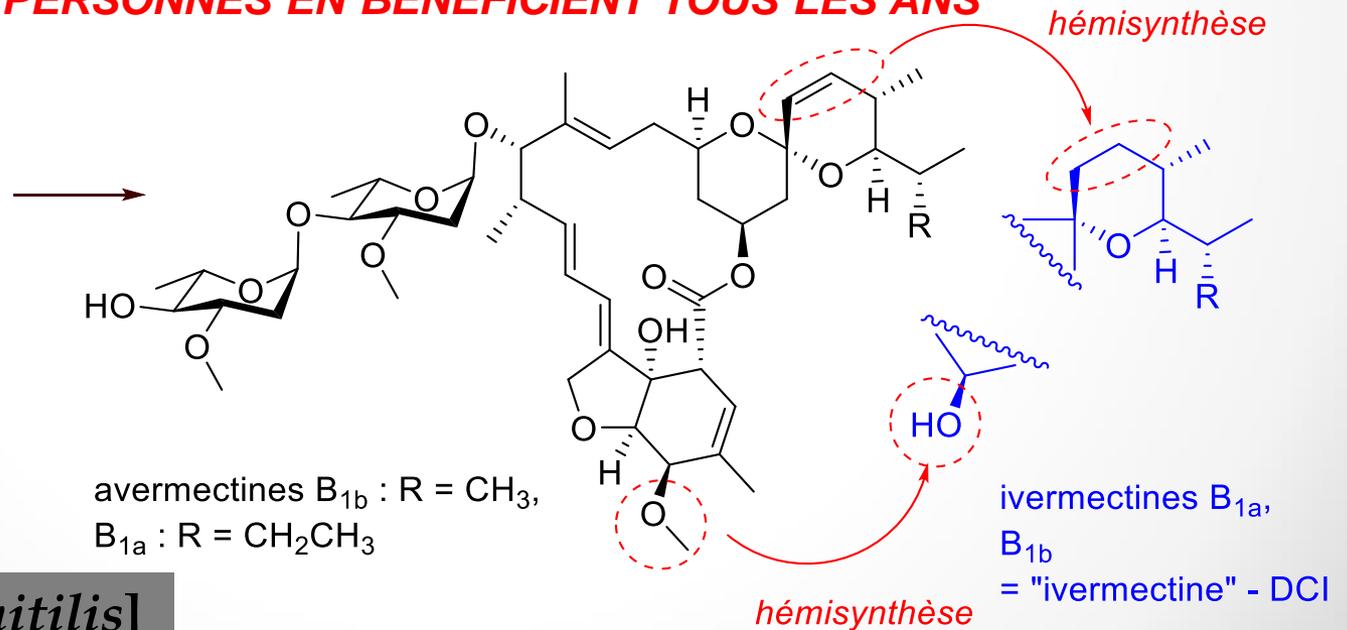
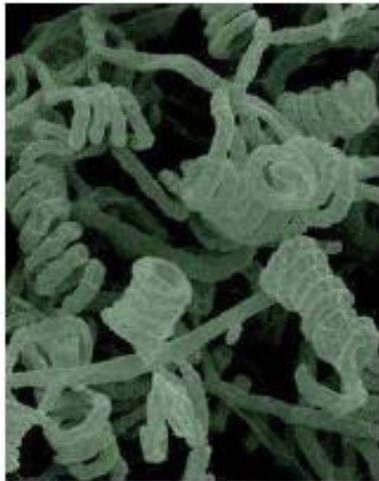
STREPTOMYCES AVERMITILIS (REBAPTISÉE *AVERMICTINIUS* (BACTÉRIE, ACTINOMYCÉTALES) **[1974]**

ORIGINE : SOLS JAPONAIS (KAWANA)

MÉLANGE COMPLEXE DE COMPOSÉS DONT DEUX TRÈS VOISINS

ANTHELMINTHIQUE À LARGE SPECTRE

250 MILLIONS DE PERSONNES EN BÉNÉFICIENT TOUS LES ANS



[*Streptomyces avermitilis*]

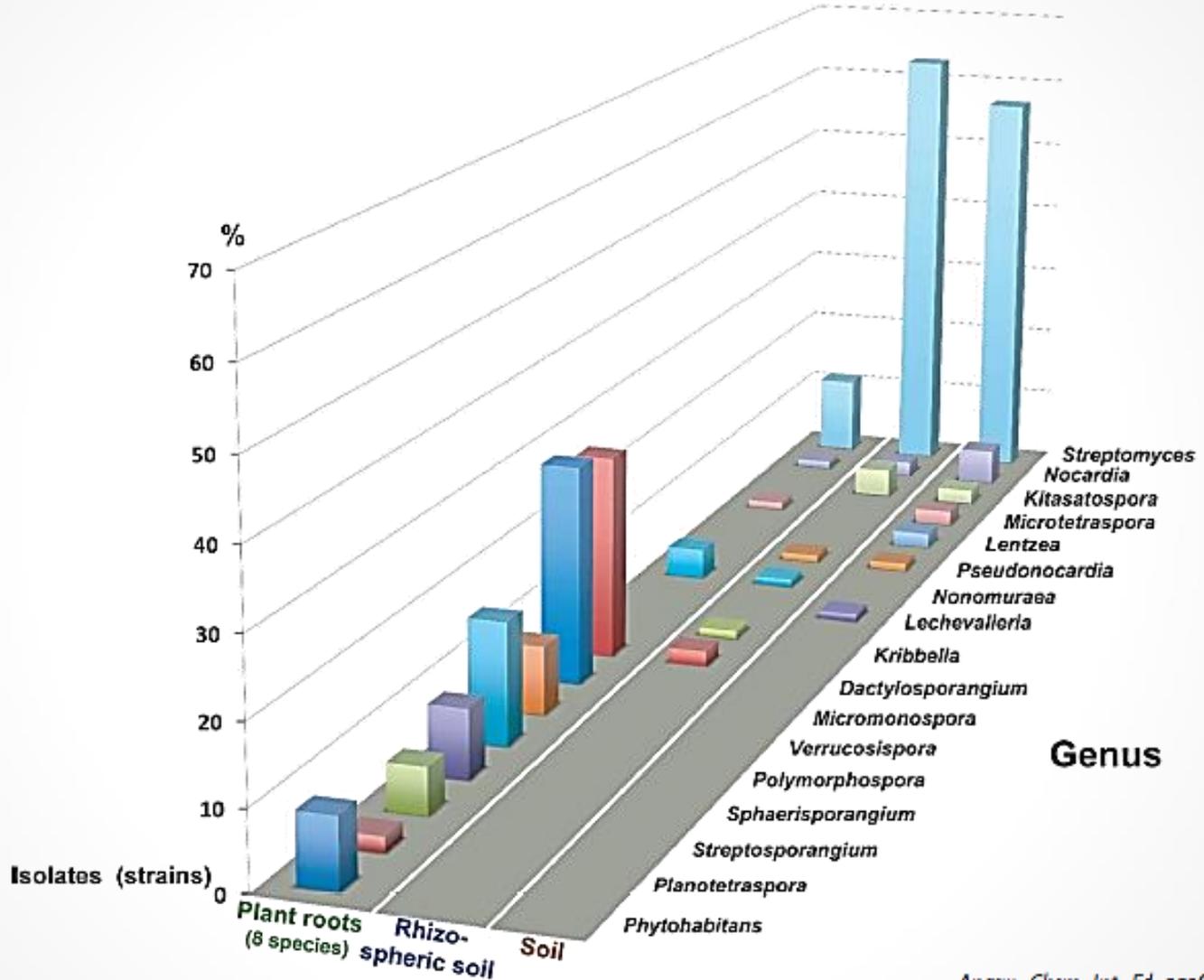


« CÉCITÉ DES RIVIÈRES » (ONCHOCERCOSE, *ONCHOCERCA VOLVULUS*)



« ELEPHANTIASIS » (FILARIOSE LYMPHATIQUE, *WUCHERERIA BANCROFTI*)

Actinomycètes



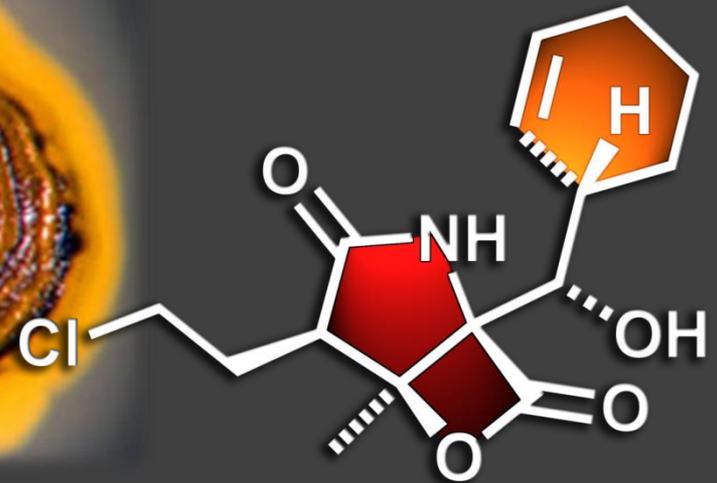
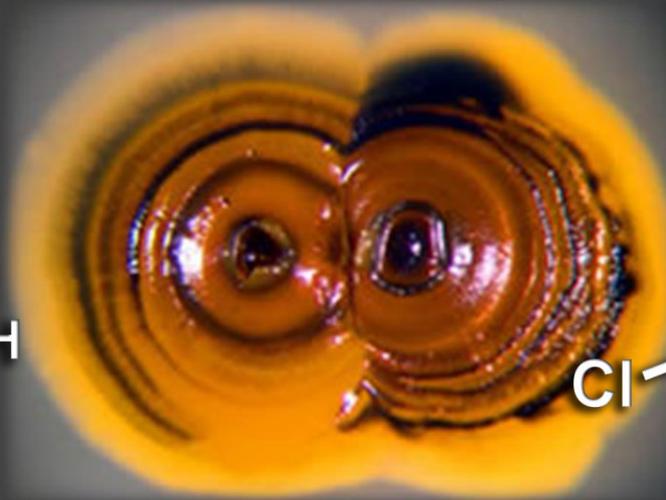
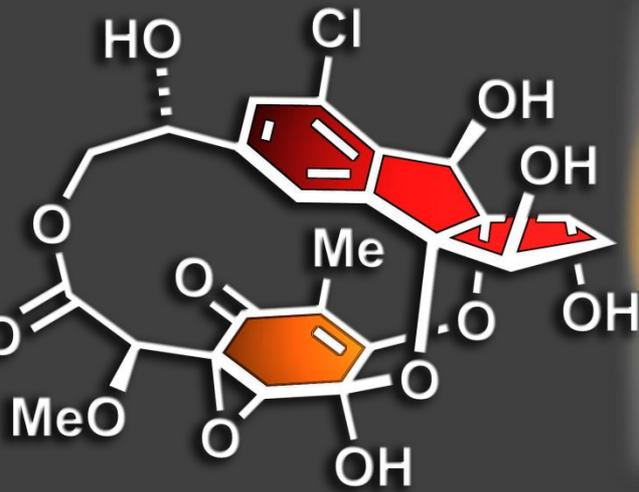
Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 10190–10209

Actinomycètes marins

SALINISPORA TROPICA (BACTÉRIE, ACTINOMYCÉTALES) [2002]

ORIGINE : SÉDIMENTS MARINS DE GRANDE PROFONDEUR

1^{ER} GENRE D'ACTINOMYCÈTE MARIN DÉCRIT [1991]



SPOROLIDE

SALINOSPORAMIDE

= MARIZOMIB (DCI) [2011]

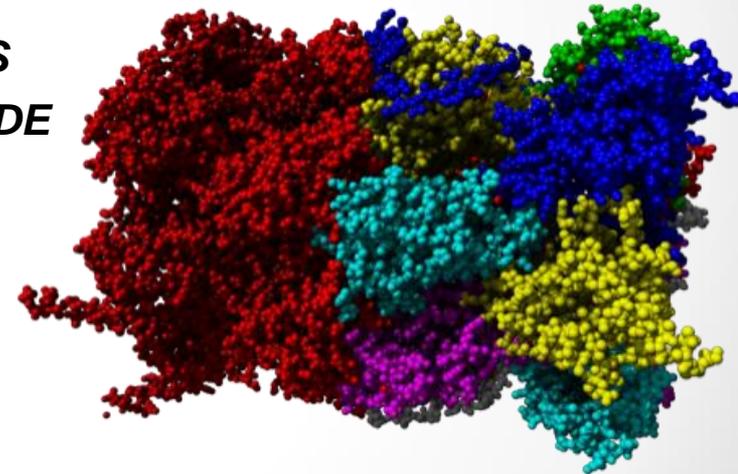
Actinomycètes marins

SALINOSPORAMIDE : UN INHIBITEUR DU PROTÉASOME

**MÉCANISME D'ACTION : INHIBITION
DU PROTÉASOME 20S**



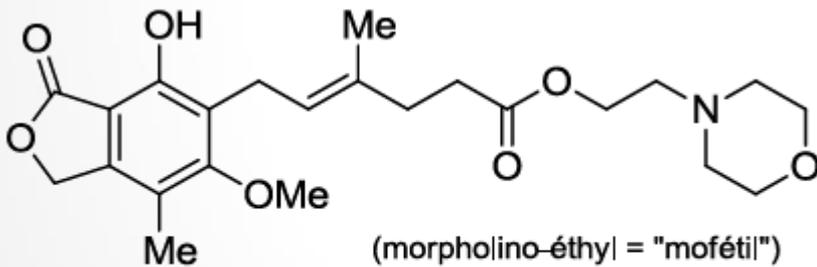
**PHASES I/II POUR LE TRAITEMENT DE TUMEURS
SOLIDES ET LYMPHOMES, SEUL OU EN
ASSOCIATION (AU VORINOSTAT). 2015 : ESSAIS
CLINIQUES PHASE I : GLIOBLASTOME. STATUT DE
MÉDICAMENT ORPHELIN (USA, EUROPE) :
MYÉLOME MULTIPLE. VOIE ORALE À L'ÉTUDE.**



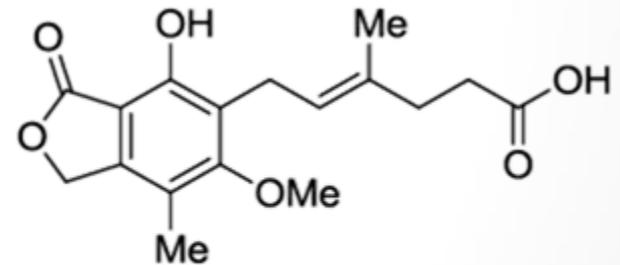
Champignons



[*Penicillium brevicompactum*]



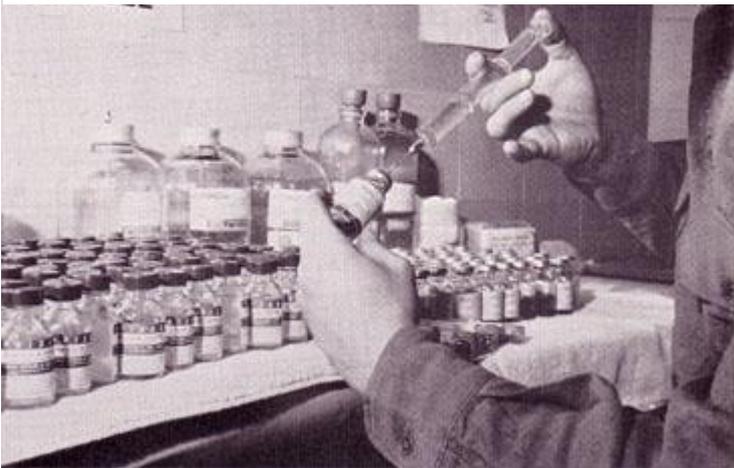
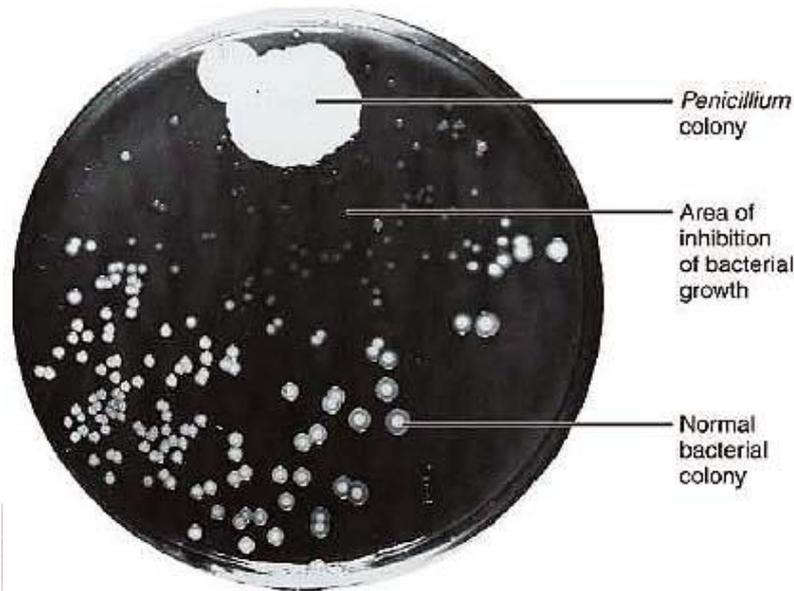
mycophénolate mofétil
[ester hémisynthétique, prodrogue]



acide mycophénolique
[*Penicillium brevicompactum*]

- ✓ Utilisé sous sa forme salifiée :
Mycophénolate sodique
- ✓ Tétralogénicité (ANSM 2016)

Champignons

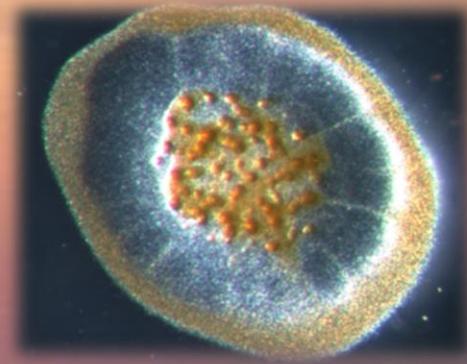


ées

V

Myxobactéries

● ÉPOTHILONE B



SORANGIUM CELLULOSUM
(MYXOBACTÉRIE), RIVIÈRE ZAMBÈSE



● IXABÉPILONE
(HÉMISYNTHÈSE)

UTILISATION : AMM 2008 (USA),
CANCERS DU SEIN MÉTASTATIQUES
ARRÊT DE LA PROCÉDURE EUROPÉENNE 2009

Où vivent-ils?

LA QUESTION DES ENDOSYMBIONTES

« ENDOSYMBIOSE » :

FORME DE SYMBIOSE DANS LAQUELLE LE SYMBIONTE VIT À L'INTÉRIEUR DE SON HÔTE, LE PLUS SOUVENT À L'INTÉRIEUR MÊME DES CELLULES DE SON HÔTE (À L'OPPOSÉ DE L'ECTOSYMBIOSE)

CHEZ LES VÉGÉTAUX : « ENDOPHYTES »

MICRO-ORGANISMES VIVANT (AU MOINS POUR UNE PARTIE DU CYCLE DE VIE) DANS LES PLANTES (FEUILLES, TIGES, RACINES, BOIS...) ET NE CAUSANT AUCUNE MANIFESTATION VISIBLE DE PATHOGÉNICITÉ.

NATURE DES MICRO-ORGANISMES : BACTÉRIES OU CHAMPIGNONS POUVANT CO-EXISTER DANS UNE MÊME PLANTE HÔTE ; FACULTATIFS OU OBLIGATOIRES.

Où vivent-ils?

LES ENDOPHYTES

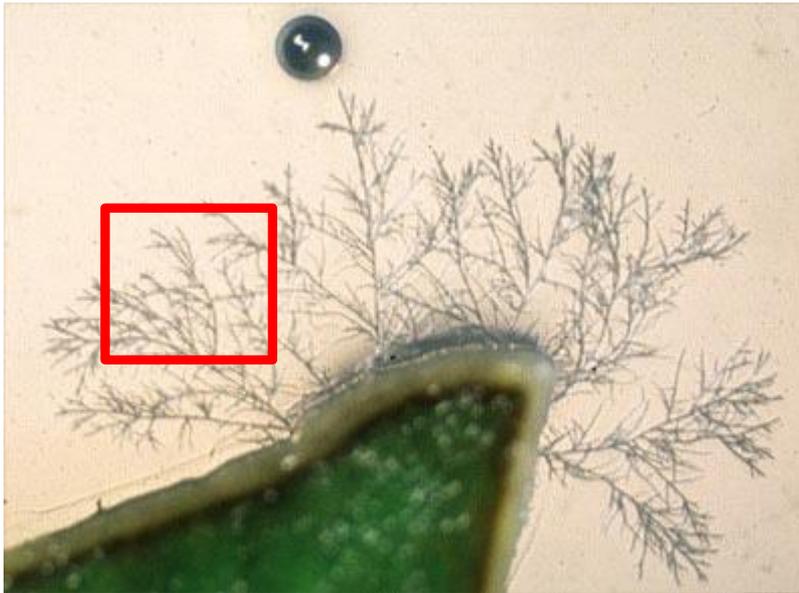
MISE EN ÉVIDENCE :



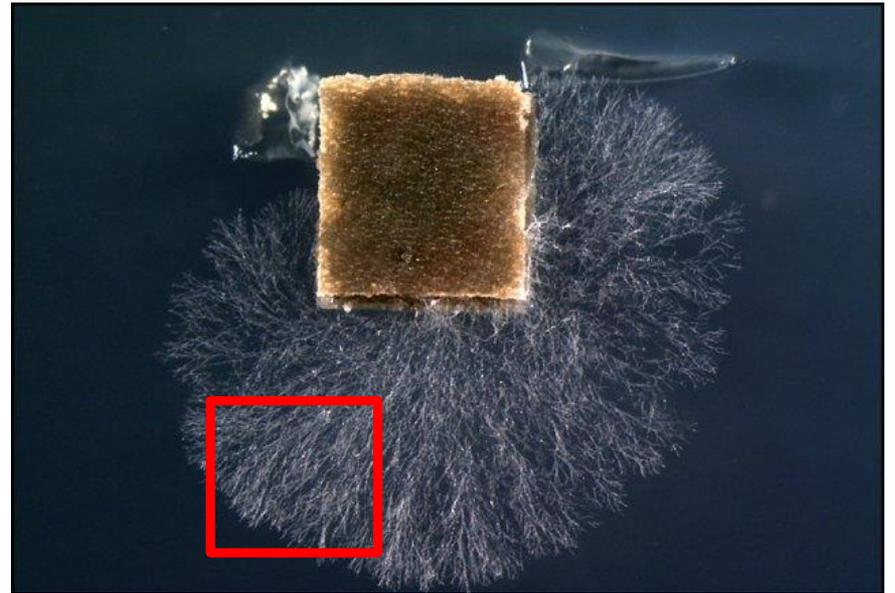
Où vivent-ils?

LES ENDOPHYTES

MISE EN ÉVIDENCE :



feuille



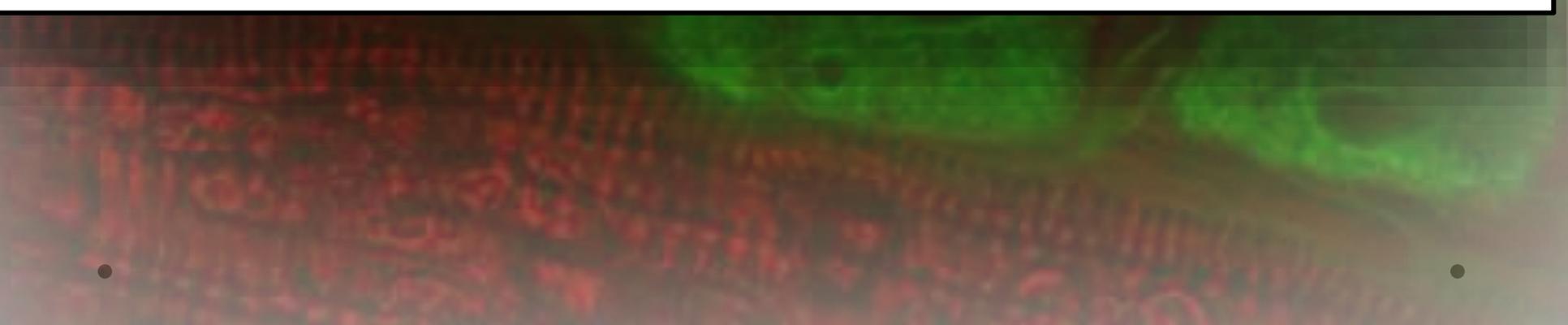
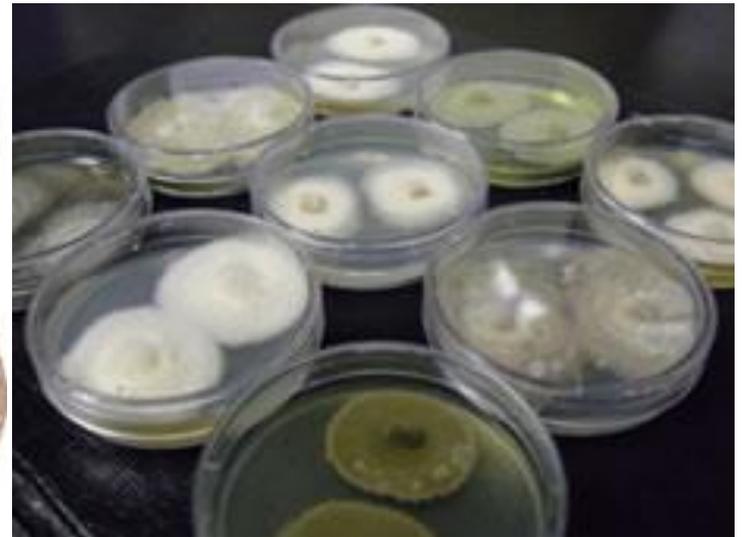
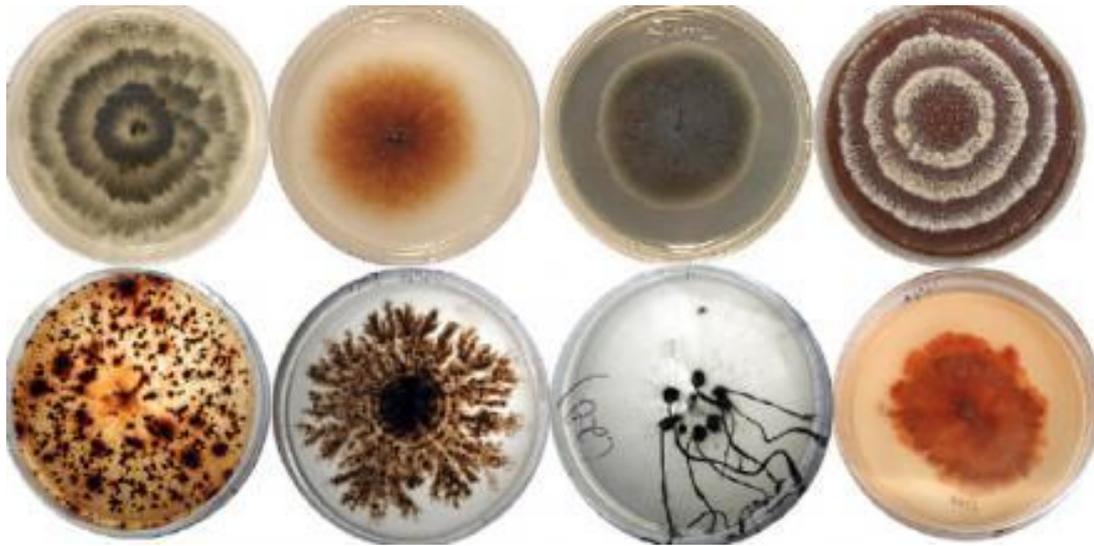
lichen

Où vivent-ils?

LES ENDOPHYTES



MISE EN CULTURE :



Qui sont-ils?

LES ENDOPHYTES

BACTÉRIES :

- BACTÉRIES FIXANT L'AZOTE (DIAZOTROPHES, NODOSITÉS) :
RHIZOBIUM SP.
- AUTRES BACTÉRIES ENDOPHYTES *STREPTOMYCES SP., PSEUDOMONAS SP., BACILLUS SP.*

CHAMPIGNONS :

- MYCORHIZES (ASSOCIATIONS CHAMPIGNONS/RACINES) ;
- CLAVICIPITACEAE (« ENDOPHYTES FONGIQUES DE TYPE I »,
POACEAE, CONVULVULACEAE)
- AUTRES ENDOPHYTES FONGIQUES (« ENDOPHYTES FONGIQUES DE
TYPE II »), ASCOMYCÈTES > BASIDIOMYCÈTES

Ascomycota/Basidiomycota

ORIGINE DES SUBSTANCES NATURELLES



● **CINCHONA SP.**
C. LEDGERIANA

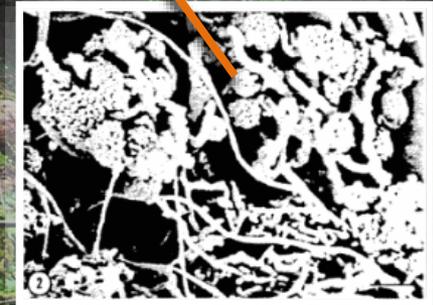
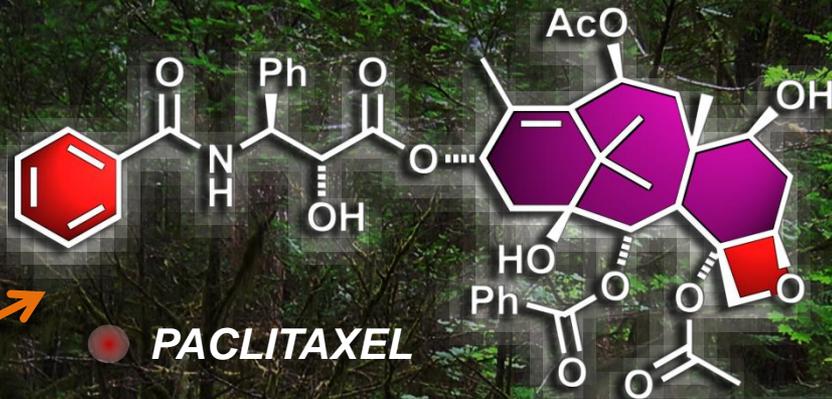


QUININE



DIAPORTHE SP.
CHAMPIGNON ENDOPHYTE

ORIGINE DES SUBSTANCES NATURELLES



IF DU PACIFIQUE
(*TAXUS BREVIFOLIA*)

TAXOMYCES ANDREANAE
CHAMPIGNON ENDOPHYTE

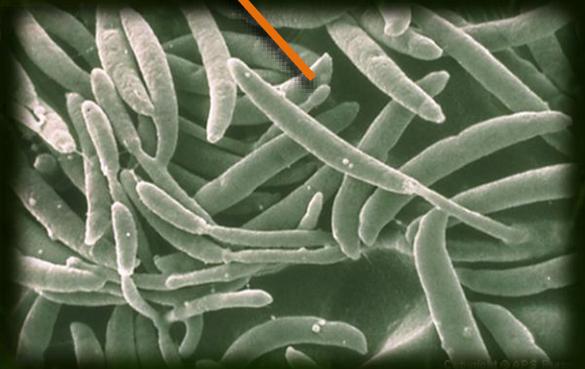
ORIGINE DES SUBSTANCES NATURELLES



● *CAMPTOTHECA ACCUMINATA*



CAMPTOTHÉCINE

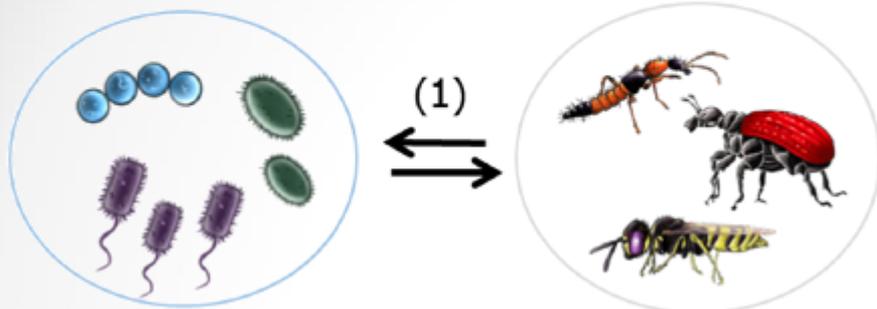


● *FUSARIUM SOLANI*

CAS DES INSECTES

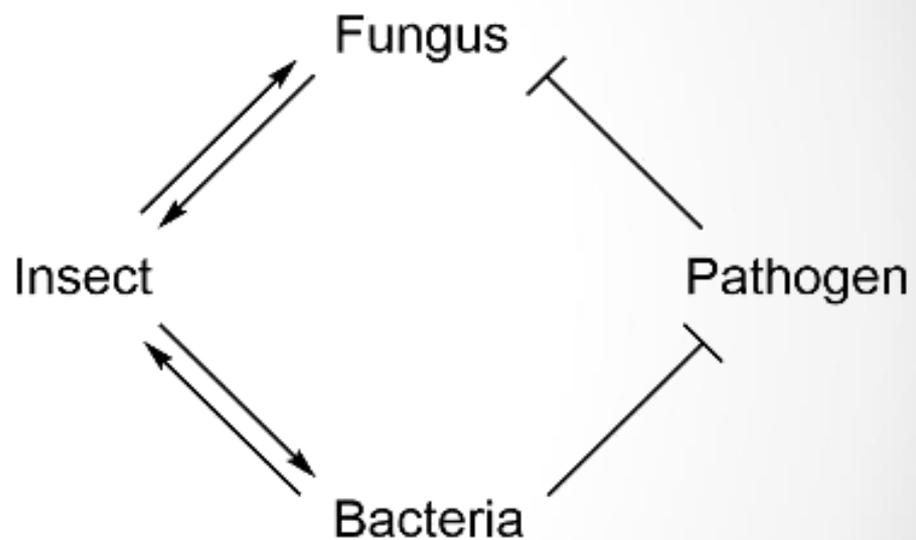
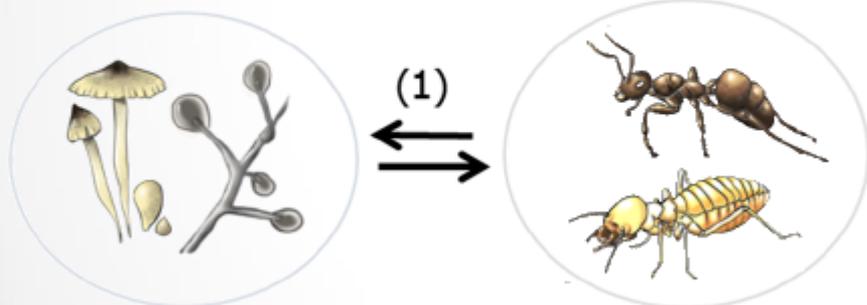
Bacterial Symbionts

Insects



Fungal Cultivar

Insects



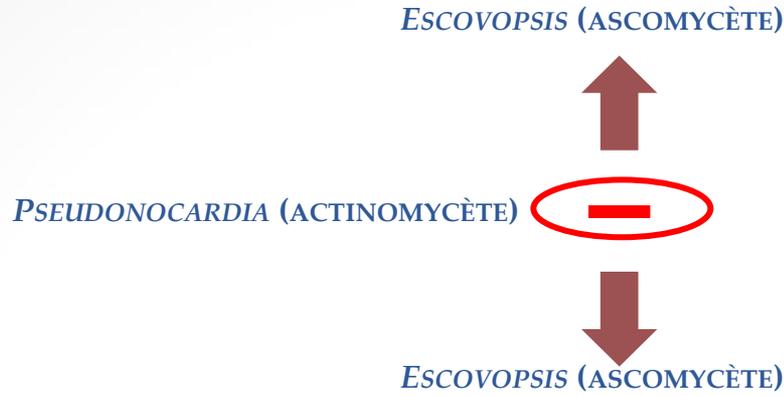


<https://www.youtube.com/watch?v=77gOk1qgiYQ>

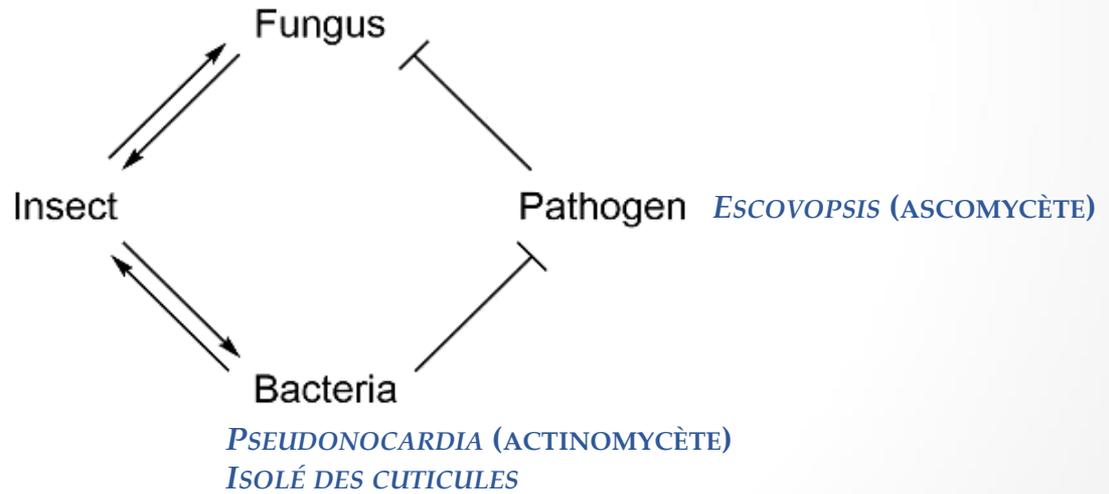
CAS DES FOURMIS



Jon Clardy



APTEROSTIGMA DENTIGERUM



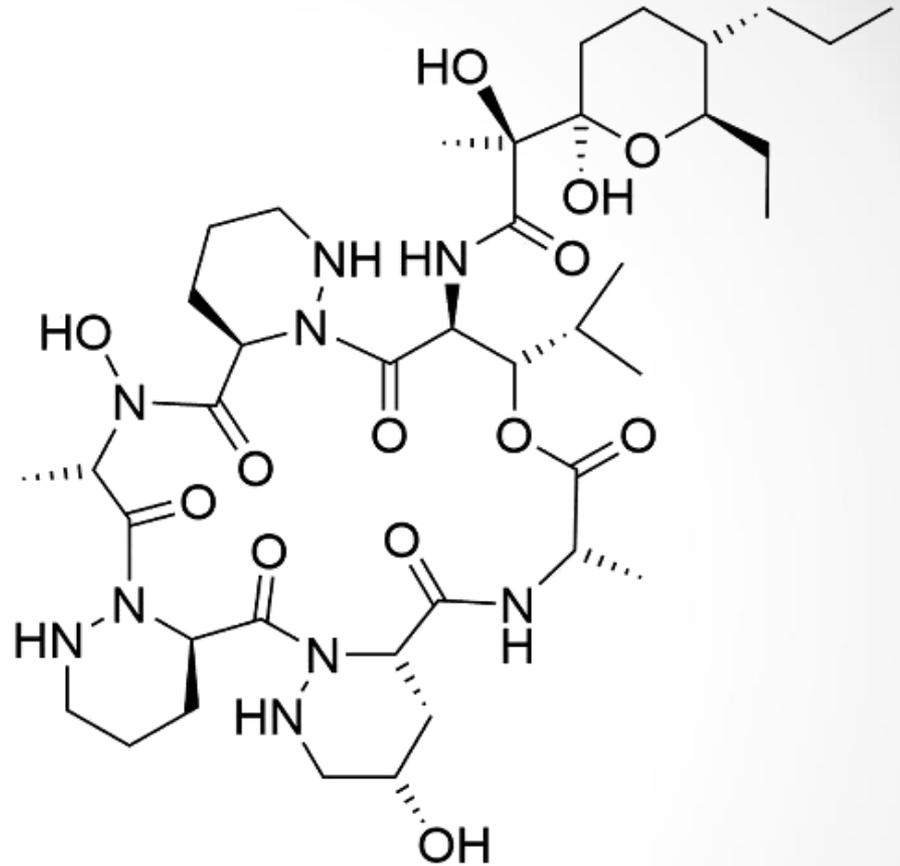


(1)
↑
↓



CAS DES FOURMIS

PSEUDONOCARDIA (ACTINOMYCÈTE)



STRUCTURE DE LA DENTIGÉRUMYCINE

CAS DES TERMITES



MACROTERMES NATALENSIS

CAS DES COLÉOPTÈRES



Dendroctonus frontalis
le dendroctone méridional du [pin](#)

<https://www.youtube.com/watch?v=qcfOyF-GnDU>

CAS DES COLÉOPTÈRES



Entomocorticium sp. A

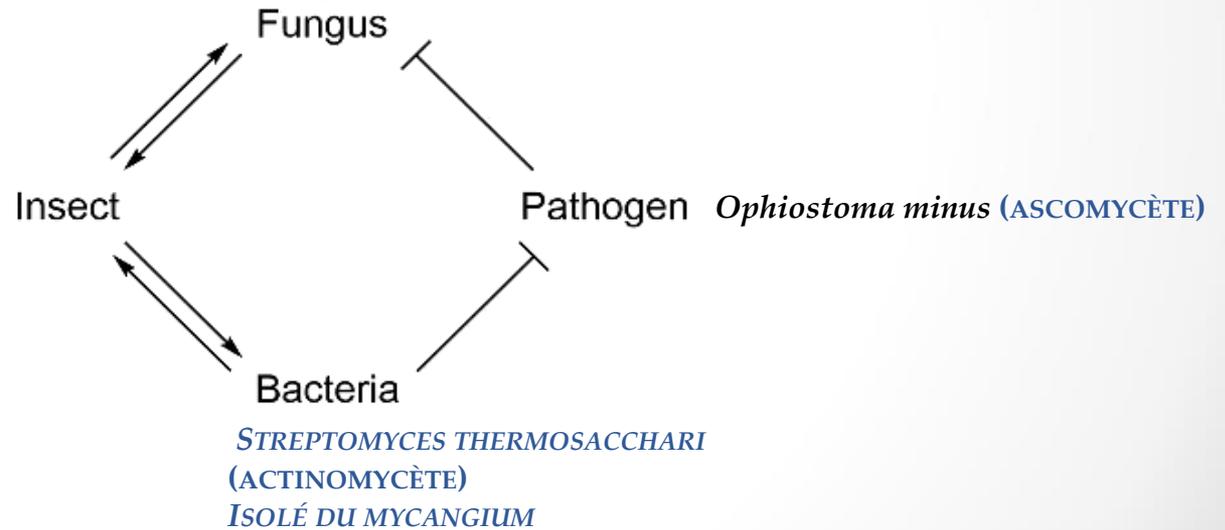


O. minus



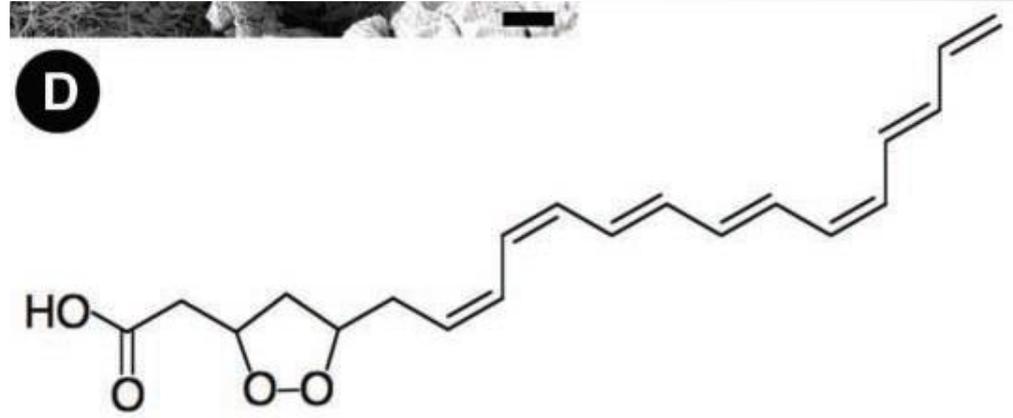
Dendroctonus frontalis

Entomocorticium sp.
Nourriture pour les larves



CAS DES COLÉOPTÈRES

STREPTOMYCES THERMOSACCHARI
(ACTINOMYCÈTE)
ISOLÉ DU MYCANGIUM

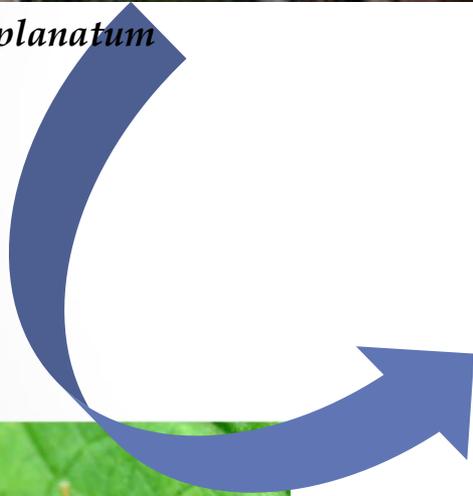


STRUCTURE DE LA MYCANGIMYCINE



A

Ganoderma applanatum



B

Agathomyia wankowiczii



C

Ganoderma applanatum

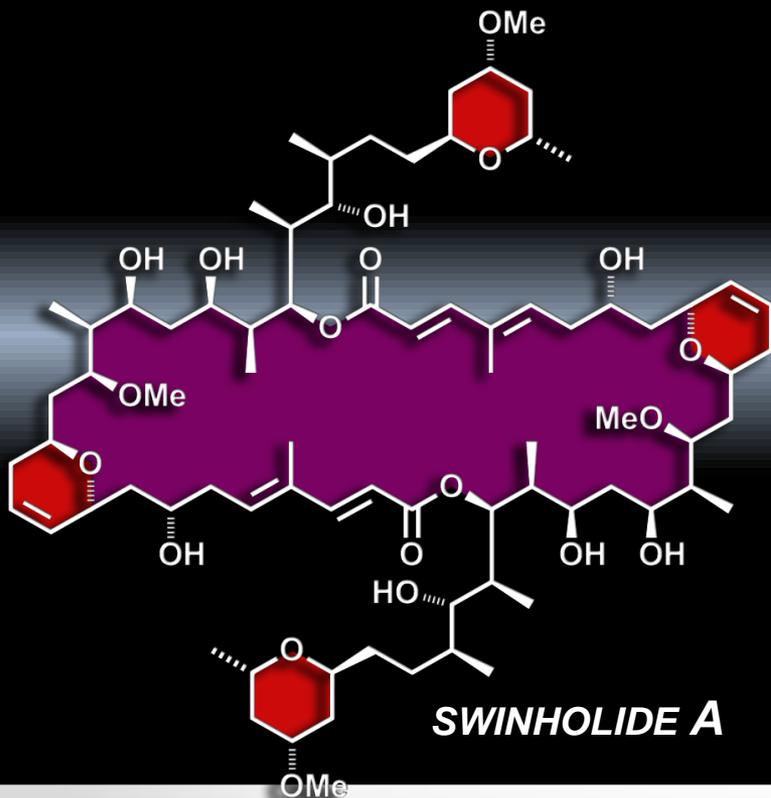
ORIGINE DES SUBSTANCES NATURELLES MARINES

ÉPONGE MARINE
THEONELLA SWINHOEI

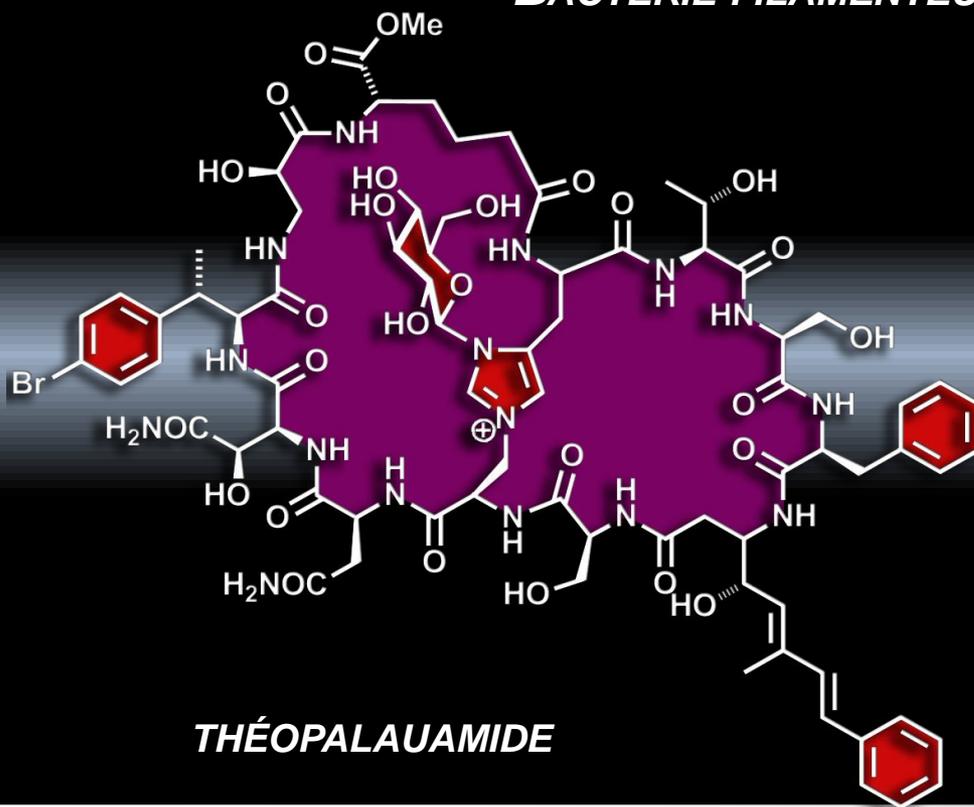


- dissociation des populations cellulaires
- centrifugation différentielle

BACTÉRIE HÉTÉROTROPHE



BACTÉRIE FILAMENTEUSE



ENDOSYMBIONTES : BILAN ET DÉFIS

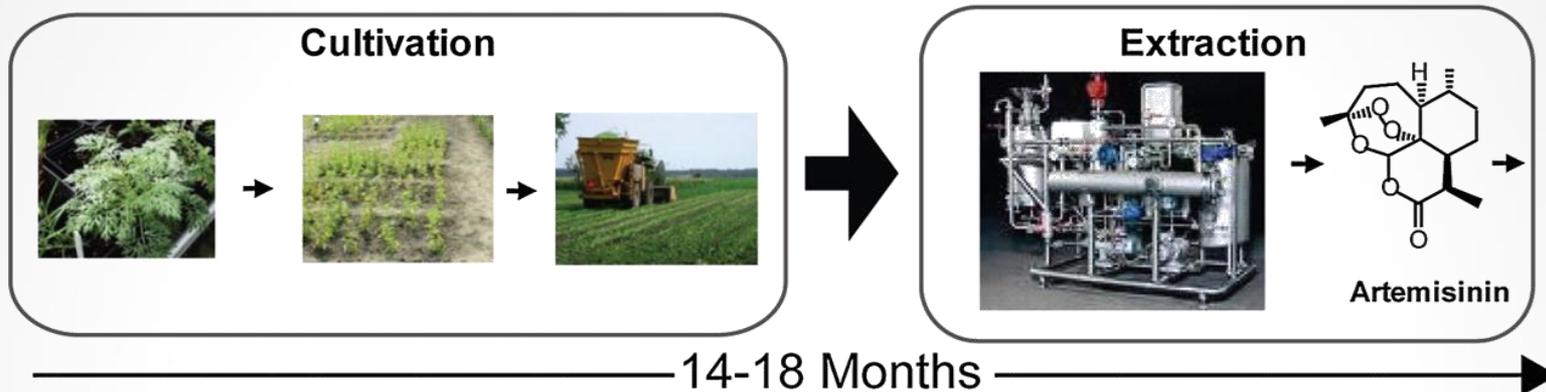
- CHERCHER LES ENDOSYMBIONTES, LES ISOLER, LES CULTIVER ;
- LES IDENTIFIER ;
- PRODUIRE INDUSTRIELLEMENT LES SUBSTANCES NATURELLES BIOSYNTHÉTISÉES ...

PRODUCTION INDUSTRIELLE DE L'ARTÉMISININE

Production of plant-derived artemisinin compared to semisynthetic artemisinin.

LEVURE

Plant-derived Artemisinin



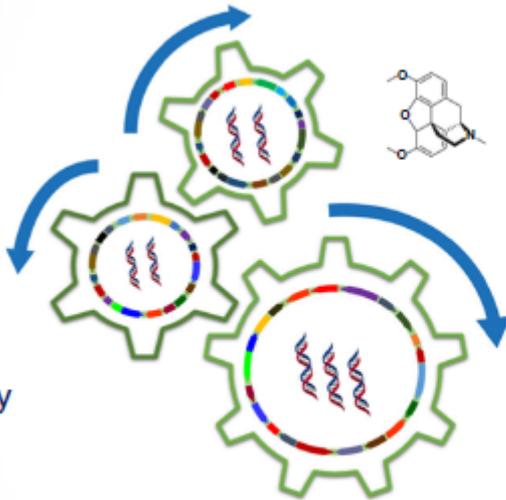
Patrick J. Westfall et al. PNAS 2012;109:655-656

Tendances actuelles

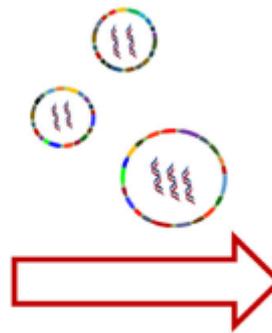
LEVURE



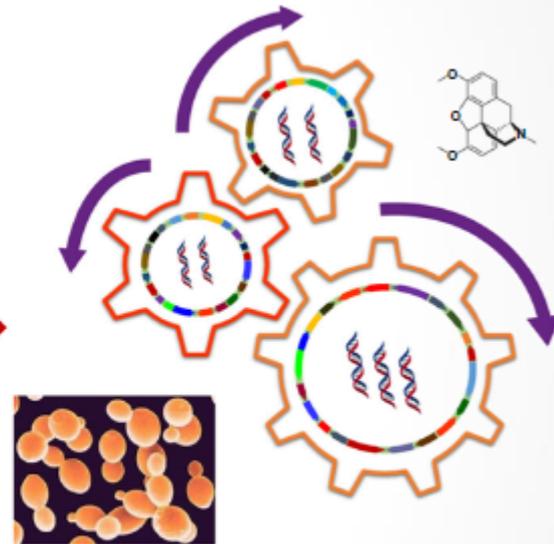
Gene discovery



Opium poppy
Papaver somniferum



Gene cloning
Transformation



Saccharomyces cerevisiae

Current Opinion in Biotechnology

BOOM OF SYNTHETIC BIOLOGY

Toggle switch
in bacteria



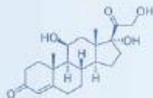
2000

First plant
genome
sequence
Arabidopsis



2005

Hydroxy-
cortisone
in yeast

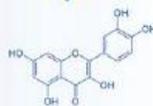


Artemisinic acid
in yeast

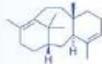


2010

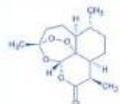
Polyphenols
in yeast



Taxol precursors
In bacteria



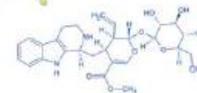
Artemisinin
in tobacco



Artemisinin
in yeast

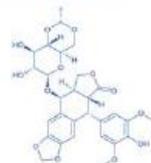


Vinca-
Alkaloid
precursors
In yeast

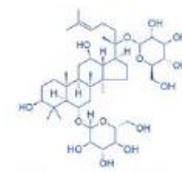
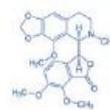


2015

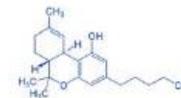
Lignans
In tobacco



Noscapine
in yeast



Ginsenosides
in yeast

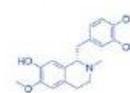


Cannabinoids
in yeast



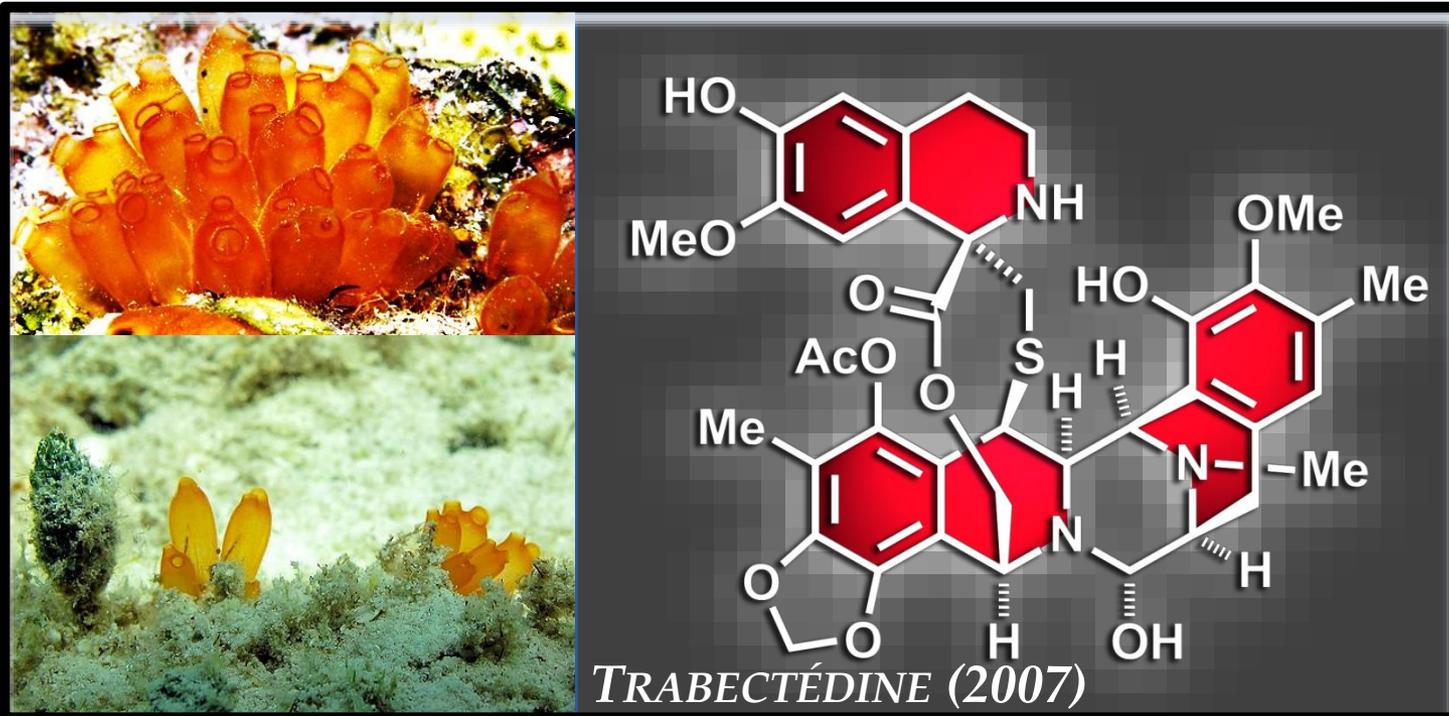
2020

New-to-nature
opioids
in yeast

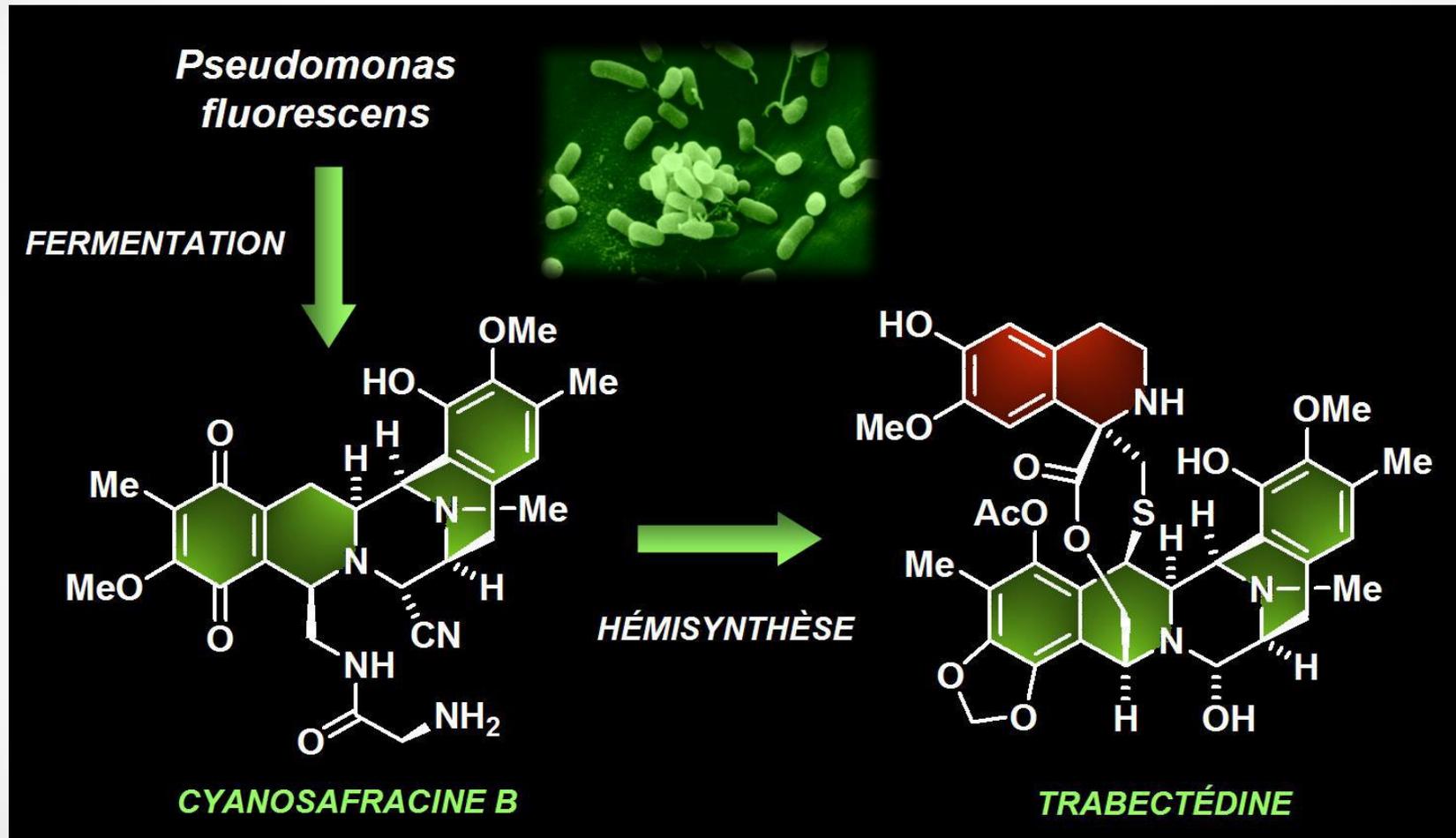


ECTÉINASCIDINE (TRABECTÉDINE DCI)

- STRUCTURE : ALCALOÏDE POLYCYCLIQUE.
- INDICATIONS : ANTITUMORAL (SARCOMES DES TISSUS MOUS, CANCER OVAIRE)
- MATIÈRE PREMIÈRE : EXTRAIT D'*ECTEINASCIDIA TURBINATA*, TUNICIER (CARAÏBES, KEYS DE FLORIDE, BAHAMAS, MÉDITERRANÉE).

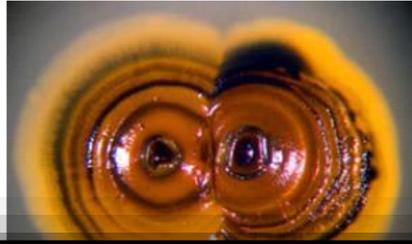


ECTÉINASCIDINE : PRODUCTION INDUSTRIELLE



PRODUCTION INDUSTRIELLE DU MARIZOMIB

laboratoire



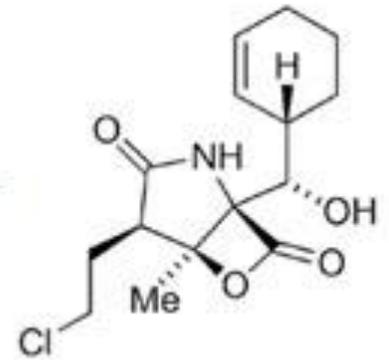
production à grande échelle



S. tropica growing on an agar plate



S. tropica growing in liquid culture



Salinosporamide A

quelques mg/L

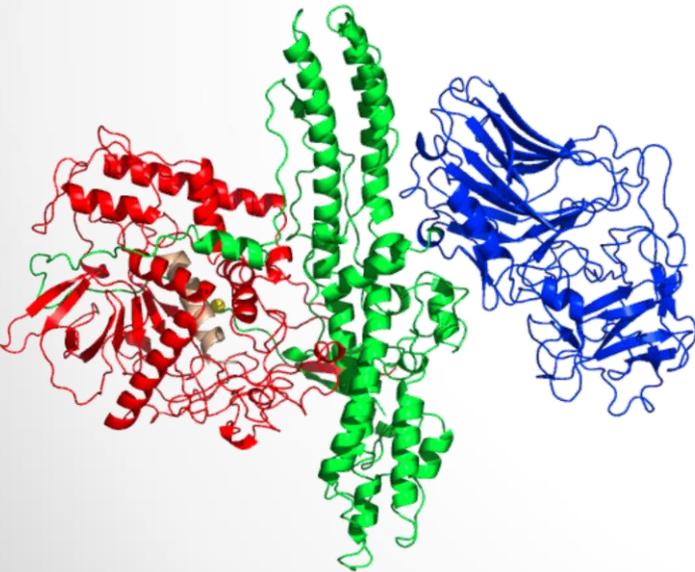
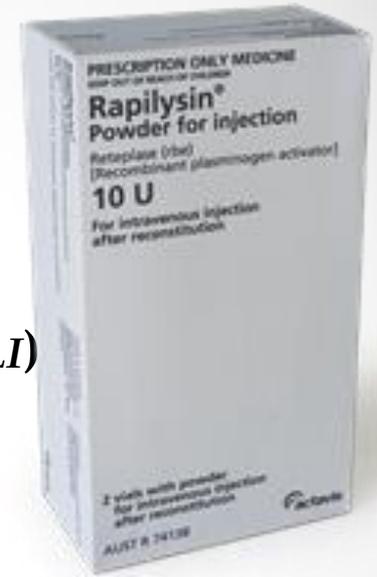


260 mg/L

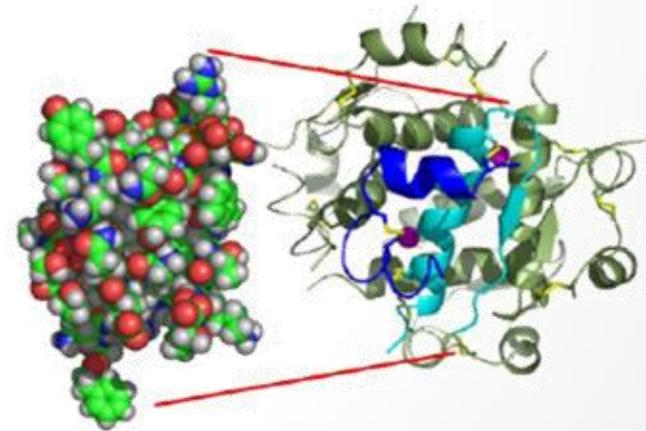
- rendement extraction ~50%
- pureté 98%

MICRO-ORGANISMES AU CŒUR DES BIOTECHNOLOGIES

- INSULINE PAR GÉNIE-GÉNTÉTIQUE (*E. COLI*)
- THROMBOLYTIQUES (UROKINASE, RÉTÉPLASE PAR *E. COLI*)
- TOXINE BOTULIQUE (*VIBRIO SP.*, *CLOSTRIDIUM*)



TOXINE BOTULIQUE



INSULINE

Mise en œuvre industrielle

- UNE CROISSANCE SUFFISANTE ABOUTISSANT À UNE QUANTITÉ IMPORTANTE DE BIOMASSE
- MAINTENIR LA BIOMASSE LE PLUS LONGTEMPS POSSIBLE DANS DES CONDITIONS DE PRODUCTION OPTIMALE
- FAIRE EN SORTE QUE LES PHASES DE CROISSANCE, DE PRODUCTION AINSI QUE LES ÉTAPES D'EXTRACTION SOIENT LES MOINS COÛTEUSES POSSIBLES.

MISE EN ŒUVRE INDUSTRIELLE

Culture en boîte
ou micro-organismes
congelés à -80 °C



Inoculum

Agitation

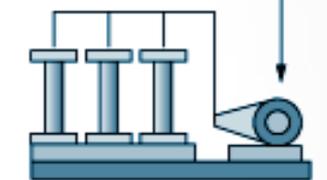
Fermenteur de
préensemencement

Fermenteur
d'ensemencement

Fermenteur de production

Récolte

Filtration

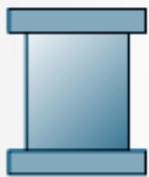


ou



Centrifugation continue

Purification
complémentaire



Extractions
additionnelles
et lavages

Extraction
par solvant

Traitement et
élimination des
effluents

Récupération
du solvant

Élimination des
micro-organismes
et des déchets

Séchage sur cylindres ou sous vide



Concentration

Formulation

Contrôle de la qualité
et conditionnement

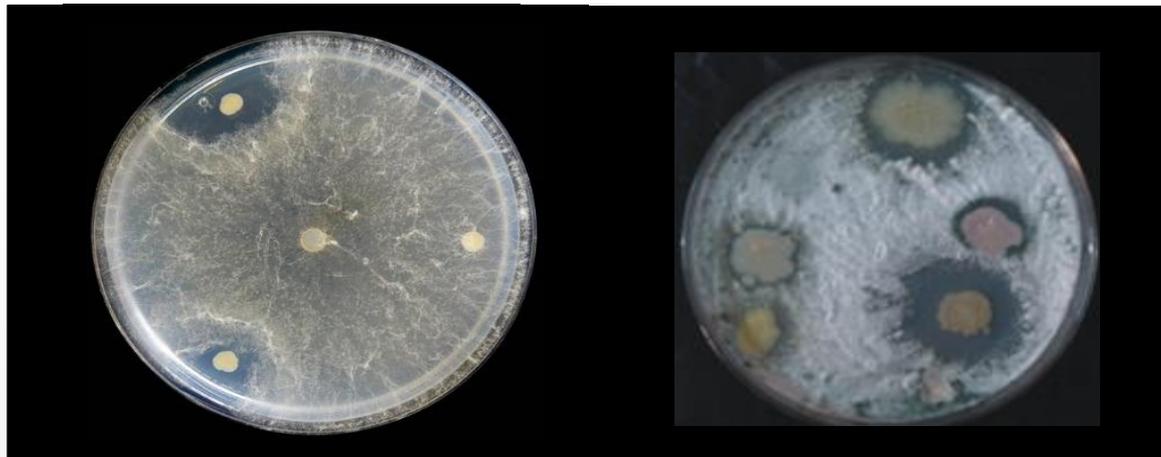
Récupération
du produit pur

Source: Kroschwitz, 1992.

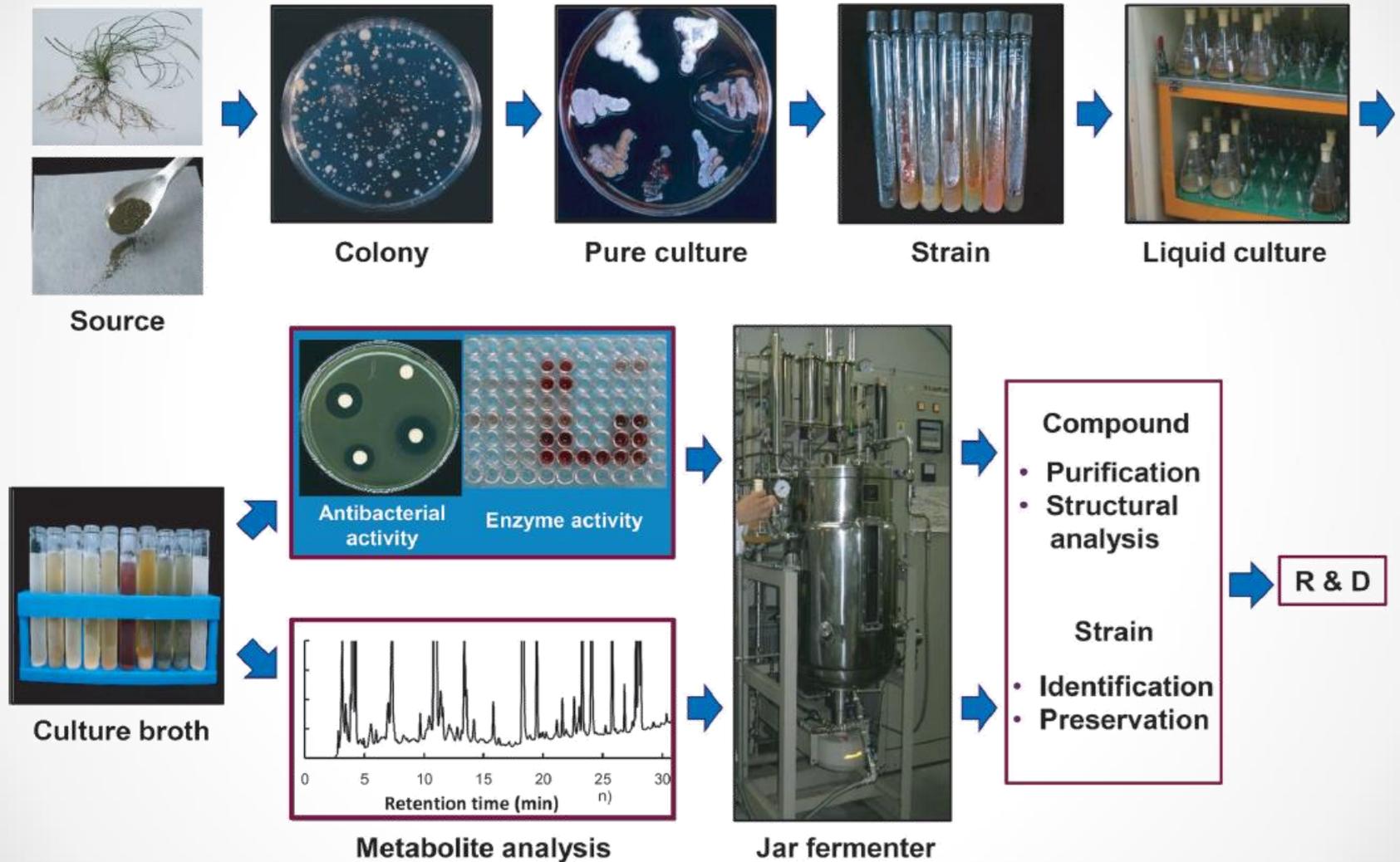
RECHERCHE DE NOUVELLES MOLÉCULES

- CULTURE TRADITIONNELLE
- SANS CULTURE (EXPRESSION HÉTÉROLOGUE, MÉTAGÉNOMIQUE)
- CULTURE *IN-SITU* (TENTER DE CULTIVER LE NON-CULTIVABLE)
99 % DES MICRO-ORGANISMES NE SONT PAS CULTIVABLES AU LABORATOIRE

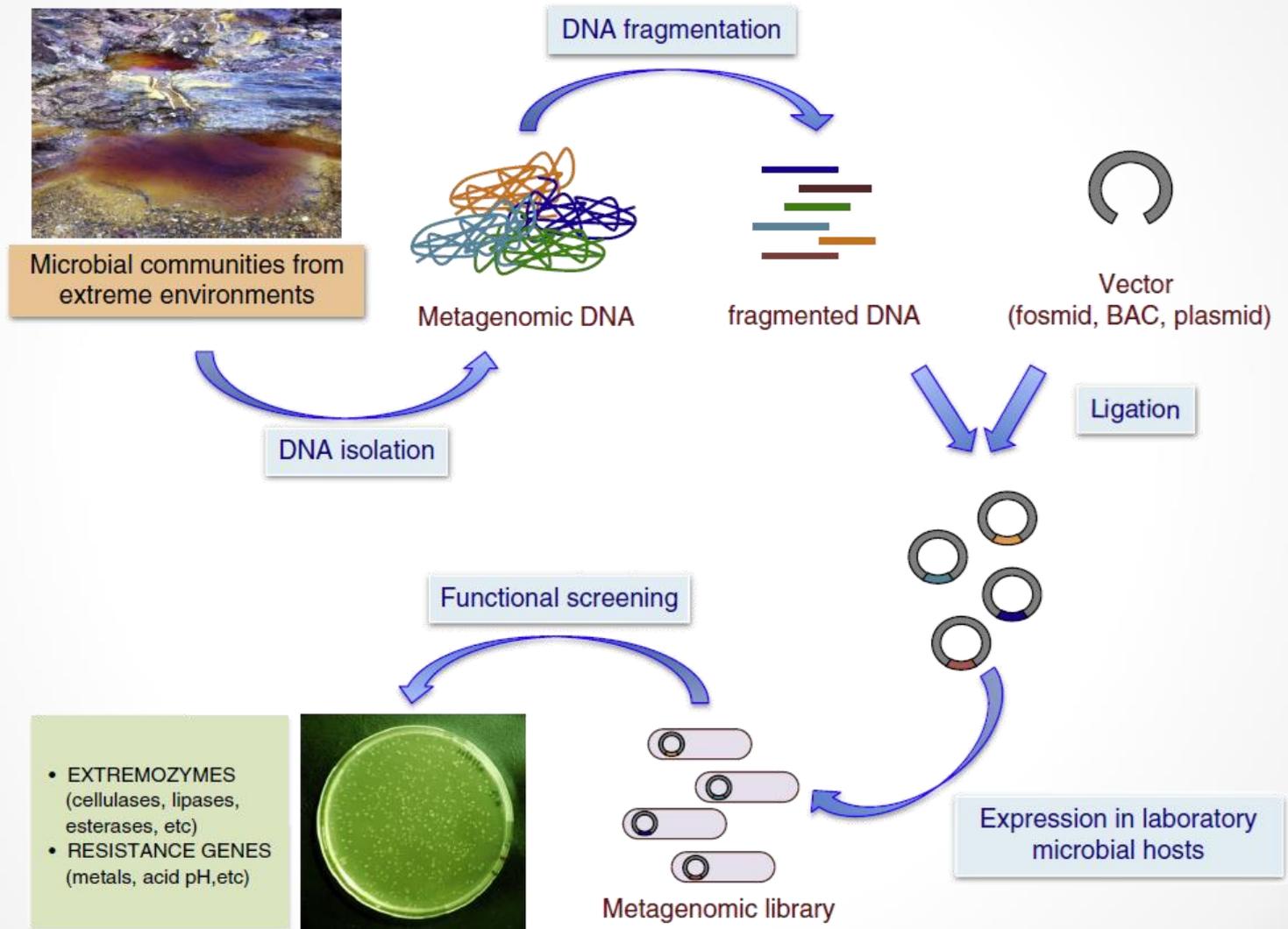
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **113**, 5970–5975 (2016).

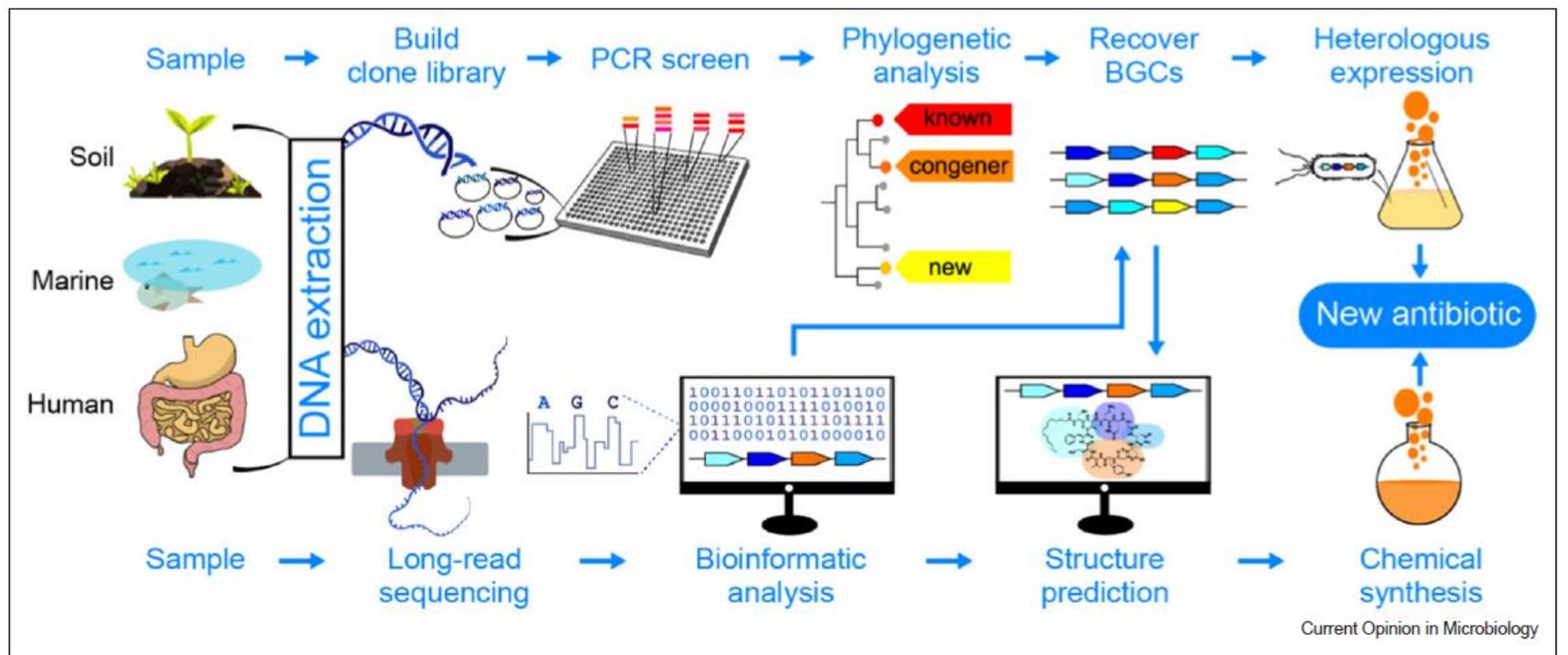


APPROCHE TRADITIONNELLE



MÉTAGÉNOMIQUE DES ENVIRONNEMENTS EXTRÊMES







Substances
naturelles



Bases de données
Anti-SMASH 6.0

EXPLORATION GÉNOMIQUE CHEZ LES MICRO-ORGANISMES

- **GÉNOMIQUE : ENSEMBLE DES TECHNIQUES FOURNISSANT DES DONNÉES EN MASSE SUR L'ADN ET LES GÈNES.**
- **EXPLORATION GÉNOMIQUE, « *GENOME MINING* » : EXPLOITATION DES INFORMATIONS GÉNOMIQUES POUR LA DÉCOUVERTE DE PROCESSUS DE BIOSYNTHÈSE, DE NOUVEAUX PRODUITS (ÉVENTUELLEMENT À PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES INTÉRESSANTES → MÉDICAMENTS...).**
- **ÉPIGÉNÉTIQUE : CHANGEMENTS D'EXPRESSION DE GÈNES QUI SURVIENNENT EN L'ABSENCE DE MUTATIONS DE L'ADN, DÉSIGNE AUSSI L'EFFET DE L'ENVIRONNEMENT, AU SENS LARGE, SUR L'EXPRESSION DES GÈNES.**
- **MÉTAGÉNOMIQUE : SCIENCE QUI ÉTUDIE SIMULTANÉMENT LES GÉNOMES DE TOUTES LES POPULATIONS D'UN MILIEU DONNÉ (POPULATIONS BACTÉRIENNES DE L'INTESTIN PAR EXEMPLE).**

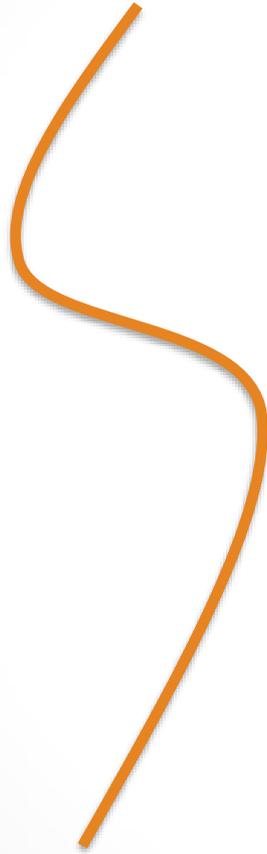
EXPLORATION GÉNOMIQUE CHEZ LES MICRO-ORGANISMES

« *GENOME MINING* » : EXPLOITER LES INFORMATIONS GÉNÉTIQUES POUR DÉCOUVRIR DE NOUVEAUX PROCESSUS, DE NOUVELLES CIBLES, DE NOUVEAUX PRODUITS DE GÈNES (SUBSTANCES NATURELLES)



LORS DU SÉQUENÇAGE GÉNOMIQUE DE DEUX ESPÈCES DE STEPTOMYCES ENTRE 2002 ET 2003, IL EST APPARU QUE *S. COELICOLOR* ET *S. AVERMITILIS* POUVAIENT EXPRIMER 10 FOIS PLUS DE MÉTABOLITES SECONDAIRES

Conclusions



Conclusions

L'INCROYABLE DIVERSITÉ CHIMIQUE DES PRODUITS NATURELS CONTINUERA À ALIMENTER LA DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX MÉDICAMENTS.

LES ACTINOMYCÈTES RESTENT UNE SOURCE INCONTESTÉE DE MÉDICAMENTS

L'EXPLORATION GÉNOMIQUE DES MICRO-ORGANISMES OUVRE LE CHAMP VERS DES DÉCOUVERTES INSOUÇONNÉES

L'AVÈNEMENT DE LA BIO-INFORMATIQUE AINSI QUE DES SCIENCES DU BIG-DATA

DE NOMBREUX BIOTOPES RESTENT INEXPLORÉS EN TERMES DE BIOPROSPECTION DE MICRO-ORGANISMES.

A lush green forest with sunlight filtering through the trees. The scene is filled with tall, slender trees and a dense canopy of vibrant green leaves. Sunlight creates dappled patterns on the forest floor, which is covered in moss and fallen leaves. The overall atmosphere is serene and natural.

Merci pour votre
attention!