



HAL
open science

Interactions insectes - micro-organismes entomopathogènes comme source d'inspiration pour la découverte concomitante de bio-insecticides et d'antimicrobiens

Seindé Touré

► **To cite this version:**

Seindé Touré. Interactions insectes - micro-organismes entomopathogènes comme source d'inspiration pour la découverte concomitante de bio-insecticides et d'antimicrobiens. Biochimie [q-bio.BM]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS065 . tel-02163933

HAL Id: tel-02163933

<https://theses.hal.science/tel-02163933>

Submitted on 24 Jun 2019

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole Doctorale : Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227

Institut de Chimie des Substances Naturelles / Métabolites de plantes et de micro-organismes

associés : isolement, synthèse et bioactivité

Interactions insectes – micro-organismes entomopathogènes comme source d'inspiration pour la découverte concomitante de bio-insecticides et d'antimicrobiens

Par Seindé TOURÉ

Thèse de doctorat en Chimie des substances naturelles

Dirigée par Véronique EPARVIER (Directeur, ICSN)
Didier STIEN (Co-directeur, LBBM)
Isabelle DUSFOUR (Co-encadrante, IPG)

Présentée et soutenue publiquement le 18 janvier 2018

Devant un jury composé de :

Mme Sylvie Michel	Professeur, Université Paris Descartes, Paris (075)	Rapporteur
Mme Lengo Angèle Mambu	Professeur, Université de Limoges, Limoges (087)	Rapporteur
Mr Didier Buisson	Directeur de recherche, MCAM, MNHN, Paris (075)	Examineur
Mr Marcelino Suzuki	Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Banuyls-sur-mer (066)	Examineur
Mr Mehdi Beniddir	Maître de conférences, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry (092)	Examineur
Mme Isabelle Dusfour	Chargée de recherche, Institut Pasteur de Guyane, Cayenne (094)	Co-encadrante de Thèse
Mr Didier Stien	Chargé de recherche, LBBM, Banuyls-sur-mer (066)	Co-directeur de Thèse
Mme Véronique Eparvier	Ingénieur de recherche, ICSN – CNRS, Gif-sur-Yvette (091)	Directeur de Thèse

Résumé

Les micro-organismes entomopathogènes sont les ennemis naturels des insectes. Ils infectent leurs hôtes en pénétrant dans leurs corps et/ou en excréant des composés insecticides. En parallèle, il a été démontré que la plupart des insectes hébergent de multiples micro-organismes symbiotiques qui jouent un rôle dans la nutrition et la défense de leurs hôtes. En conséquence, au cours du processus de colonisation, les micro-organismes entomopathogènes interfèrent avec ces micro-organismes bénéfiques. Ainsi, les interactions entre les insectes et les micro-organismes pathogènes peuvent induire la production d'insecticides et/ou de métabolites antimicrobiens.

A partir d'insectes vivants infectés par des champignons entomopathogènes nous avons isolé 57 micro-organismes. Les extraits à l'acétate d'éthyle de ces micro-organismes ont été évalués pour leurs activités antimicrobiennes et insecticides sur quatre micro-organismes pathogènes pour l'Homme et sur les larves du moustique *Aedes aegypti*. Le criblage biologique a mis en évidence l'activité de plusieurs souches dont 6 ont été sélectionnées pour une étude chimique plus approfondie : deux champignons du genre *Mucor*, *Isaria farinosa*, *Pestalotiopsis theae* et les bactéries des genres *Pantoea* et *Asaia*.

L'étude de ces extraits a permis l'isolement de 41 composés dont 10 sont nouveaux, parmi lesquels on retrouve des dérivés tétrahydrofuraniques, des dérivés d'acides tétramiques ou encore une macrolactone au squelette original. Des activités insecticides mais aussi antimicrobiennes ont été trouvées pour ces composés.

La capacité biosynthétique de deux souches a également été explorée par une approche OSMAC couplée à des analyses métabolomiques par UHPLC-HRMS².

Si la recherche de composés insecticides et antimicrobiens représente un défi mondial pour la santé publique face au phénomène croissant de résistance et de toxicité, ce travail montre que l'étude des interactions spécifiques entre les micro-organismes entomopathogènes et leurs insectes cibles peut conduire à la découverte de nouveaux composés prometteurs, d'intérêt pharmaceutique et écologique.

Abstract

Entomopathogenic microorganisms are natural enemies of insects. They infect their hosts by penetrating the body and excreting insecticidal compounds. However, it has been shown that most insects host multiple symbiotic microbes which perform many important functions like nutrition and defense. During the process of colonization, entomopathogenic microorganisms interfere with these beneficial microbial species. Thus, interactions between insects and insect pathogenic microorganisms should trigger the production of insecticides and/or antimicrobial metabolites.

In this project, 57 microorganisms were isolated from alive infected insect cuticles. Ethyl acetate extracts of each strain were evaluated for their antimicrobial and insecticidal activities on four human pathogenic microorganisms and *Aedes aegypti* mosquito larvae. The screening highlighted several active strains, and 6 were selected for further chemical investigations. The selected ones were two fungal strains of the *Mucor* genus, *Pestalotiopsis theae* and *Isaria farinosa* and the bacterial strains were *Pantoea* sp. and an *Asaia* sp.

The chemical study allowed us to isolate 41 compounds, 10 were new: tetrahydrofuran and tetramic acids derivatives, or a macrolactone with an original skeleton among others. Some of them presented insecticidal and antimicrobial activities.

The biosynthetic potential of two strains was also investigated by an OSMAC approach coupled to metabolomics analyses by UHPLC-HRMS2.

If the search for insecticidal and antimicrobial molecules represents a global challenge for public health, to face the increasing phenomenon of resistance and toxicity, this work demonstrated that studying specific interactions occurring between entomopathogenic microorganisms and their target insects may lead to the discovery of new promising compounds of pharmaceutical and ecological interest.

Remerciements

Le travail de recherche présenté ici a été effectué au sein de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN – CNRS) sous la direction des Dr. Véronique Eparvier, Didier Stien et Isabelle Dusfour.

Ainsi je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements et ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse, Véronique Eparvier et Didier Stien. Je vous remercie de m'avoir accueillie, soutenue et accompagnée tout du long depuis mon master. Qui eût cru que l'aventure serait si longue ! Je vous suis reconnaissante pour tout le savoir et les connaissances transmises durant ces années. Merci Véronique de m'avoir donné autant de liberté dans la gestion de cette thèse, pour ta bonne humeur et tes qualités humaines. Didier, tes larges compétences et ta rigueur scientifique m'ont beaucoup appris, elles resteront une ligne directrice à l'avenir dans mon travail de chercheur.

Je remercie également le Dr. Isabelle Dusfour pour avoir co-encadré ces travaux de recherche. J'ai apprécié ta sympathie, tes conseils scientifiques et personnels, qui m'auront beaucoup apporté tout au long de cette thèse.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie le Dr. Angèle Lengo Mambu et le Dr. Sylvie Michel d'avoir accepté d'être rapporteurs. Mes remerciements vont également au Dr. Didier Buisson, Dr. Marcelino Suzuki et Dr. Mehdi Beniddir d'avoir accepté de participer à ce jury.

J'adresse aussi mes remerciements aux membres de mes comités de thèse : le Dr. Alexandre Maciuk, le Dr. Fabrice Chandre, et le Dr. Christophe Duplais pour leurs remarques et leurs conseils avisés ayant permis de faire avancer ma réflexion.

Mes recherches n'auraient pu être réalisées sans les différents services présents au sein de l'ICSN et sans les différentes collaborations menées au cours de ces trois années. Ainsi je tiens à remercier le service de RMN (Jean-François Gallard), le service d'HPLC/Spectrométrie de masse (Nicolas Elie, Odile Thoison), le service de cristallographie (Pascal Retailleau) et le service informatique (David Lê et Guillaume Loire). Je remercie Christian Lechat, Charlotte Gourmel et Alexandra Magro pour m'avoir fourni le matériel biologique. Je remercie le Pr. Jean-Luc Wolfender, le Dr. Pierre-Marie Allard, les futurs Dr. Léonie Pélissier et Florent Olivon, pour leur aide et leur expertise sur les réseaux moléculaires. Je remercie également Sandy Desrat pour son soutien et son aide en chimie de synthèse ainsi que le Dr. Gregory Genta-Jouve pour son apport scientifique.

Je remercie l'Institut Pasteur de Guyane et l'ensemble des membres de l'« unité de Contrôle et Adaptation des Vecteurs » pour leur accueil chaleureux : Romain, Pascal, Amandine, Romuald, Jean, sans oublier Lan et Nausicaa. Merci pour votre bonne humeur, votre disponibilité et tous les bons moments passés ensemble, au laboratoire et pendant nos escapades à travers la nature guyanaise ! Une pensée pour Sarkis et Christophe, belles rencontres de Guyane, merci pour votre bonne humeur, votre gentillesse, tout ces bons moments passés à siroter le thé la belle étoile.

Ces longues journées passées au laboratoire n'auraient été aussi plaisantes et supportables sans ma superbe équipe des « filles du 23B », passées et présentes. Je remercie donc tout particulièrement Amandine-Didine, Morgane-Bartocche, Oriane-ObOb, sans oublier ma Lolo. Dévaliser le distributeur et la boulangerie de Mme P. resteront des moments forts de cette thèse. Cholesterol, diabète et autres AGEs, bienvenus ! Je remercie également Jonathan pour ses précieux conseils, toujours gentiment délivrés (Lol !), Yannick pour sa bonne humeur quotidienne ainsi que Mathilde, Tiphaine et Charlotte pour leur soutien et les bons moments passés ensemble.

Merci à mes amies d'enfance : Anais, Delphine, et Isabelle pour votre soutien sans faille, même lorsque je ne le méritais pas, vous êtes géniales ! Adel, tu en as tellement parlé, voilà je l'ai réalisé, merci pour ta confiance inébranlable. Je remercie Bintou, Amélie, Dalila, Fabrice, Sonia, Elodie, Ush, Jérôme, Pricilia, Nestor, et Sabrina de m'avoir motivée et encouragée tout du long.

Et enfin pour terminer, j'adresse toute mon affection et mes plus sincères remerciements à ma famille. Voilà la réponse à votre incessante question : « Quand est-ce que tu finis ta thèse ? » ! Merci pour votre confiance, vos encouragements, votre soutien indéfectible, lorsque je perdais espoir ou que le moral n'y était plus. Votre enthousiasme à l'égard de mes travaux m'aura donné la force d'aller au bout des choses. Faut-il tous vous citer ? Allons-y, les aînés en premier : Kanshee, Nacim, Daho, Tortuip, Gorgeous, puis les petits : Kabouz, Swaggy, Doums et Yems.

Mention spéciale à Nacim et Kabouz, qui m'ont supportée plus que personne... MERCI !

Une pensée à mes parents, présents ou non, pour m'avoir inculqué de solides valeurs et la persévérance, qui me portent et me guident chaque jour.

Merci...

Table des matières

Résumé.....	1
Abstract	2
Remerciements	3
Table des matières	5
Table des illustrations.....	8
Liste des tableaux.....	11
Liste des abréviations	12
Introduction	15
Etat de l'art.....	21
1 Interactions insectes – micro-organismes	23
1.1 Les relations de mutualisme.....	24
1.1.1 Les symbioses protectrices	24
1.1.2 Les symbioses nutritives.....	28
1.2 Les relations de parasitisme : les micro-organismes entomopathogènes.....	30
1.2.1 Les champignons entomopathogènes	30
1.2.2 Métabolites bioactifs isolés de champignons entomopathogènes	32
1.2.3 Les bactéries entomopathogènes	35
1.2.4 Métabolites bioactifs isolés de bactéries entomopathogènes	38
2 Les antimicrobiens actuels	40
2.1 Classe et mode d'action des antibactériens.....	41
2.1.1 Antibactériens ciblant la paroi cellulaire	42
2.1.2 Antibactériens inhibant la synthèse protéique	44
2.1.3 Antibactériens ciblant l'ADN et l'ARN	46
2.1.4 Autres antibactériens	47
2.2 Classe et mode d'action des antifongiques	48
2.2.1 Les fluoropyrimides.....	48
2.2.2 Les antifongiques polyèniques	49
2.2.3 Les antifongiques azolés.....	51
2.2.4 Les échinocandines.....	52
2.2.5 Autres antifongiques.....	54
3 Les insecticides	55
3.1 Classe et mode d'action des insecticides chimiques	56
3.1.1 Les insecticides organochlorés	57
3.1.2 Les insecticides organophosphorés	58
3.1.3 Les carbamates	59
3.1.4 Les pyréthrinoïdes	59
3.1.5 Les néonicotinoïdes	60
3.1.6 Autres insecticides	62
3.2 Les insecticides naturels.....	63
3.2.1 Les biopesticides d'origine végétale	63
3.2.2 Les biopesticides microbiens.....	65
4 Les phénomènes de résistances	68

4.1 La résistance aux antimicrobiens	68
4.1.1 La résistance bactérienne	69
4.1.2 La résistance fongique	70
4.2 La résistance aux insecticides	72
4.3 Situation actuelle et mesures	74
Résultats	79
1 Résultats préliminaires	81
1.1 Récolte et identification du matériel biologique	81
1.2 Isolement des micro-organismes associés aux insectes	82
1.3 Identification des micro-organismes	83
2 Criblage biologique des extraits	85
2.1 Cibles biologiques	85
2.1.1 <i>Aedes aegypti</i> : un moustique vecteur d'arboviroses	85
2.1.2 Micro-organismes pathogènes	87
2.2 Résultats du criblage biologique	88
2.2.1 Activité insecticide	88
2.2.2 Activité antimicrobienne	89
2.2.3 Activité cytotoxique	89
3 Etude chimique des extraits de <i>Mucor</i> sp. SNB-VECD11D & SNB-VECD13A.....	97
3.1 Article 1: Two new tetrahydrofuran derivatives from the fungus <i>Mucor</i> spp. SNB-VECD11D isolated from the Chrysomelidae <i>Acalymma bivittula</i>	101
3.2 Article 2: Mucorolactone, a unique macrolactone from <i>Mucor</i> spp. SNB-VECD13A, a fungus isolated from the cuticle of a Vespidae species	126
4 Etude chimique de l'extrait de <i>Isaria farinosa</i> SNB-CLL10038	163
4.1 Article 3: OSMAC and metabolomics-based approaches for the targeted isolation of antimicrobial tetramic acids derivatives from <i>Isaria farinosa</i> SNB-CLL10038	168
5 Etude chimique de l'extrait de <i>Pantoea</i> sp. SNB-VECD14B	223
5.1 Article 4 : Characterization and structure-activity relationship study of lipoaminoacid and synthetic analogues from <i>Pantoea</i> sp. SNB-VECD14B	227
6 Etude chimique de l'extrait de <i>Pestalotiopsis theae</i> SNB-VECD14E.....	325
7 Etude chimique de l'extrait d' <i>Asaia</i> sp. SNB-VECD15A	333
Analyse transversale.....	341
Discussion et Conclusion	351
Partie expérimentale	363
1 Matériel biologique	365
1.1 Isolement des micro-organismes associés aux insectes	365
1.2 Identification génétique des micro-organismes	366
1.3 Culture « standard » des micro-organismes	366
1.4 Cultures utilisées pour la mise en place des méthodes OSMAC	367
1.5 Culture à grande échelle des micro-organismes	368
2 Etude chimique des extraits.....	368
2.1 Procédure générale	368
2.1.1 Solvants et réactifs.....	368
2.1.2 Extraits de souches	368
2.1.3 Fractionnement et purifications	369

2.2 Etude par fractionnement bio-guidé de la souche SNB-VECD11D	372
2.3 Etude par fractionnement bio-guidé de la souche SNB-VECD13A	374
2.4 Etude par fractionnement bio-guidé de la souche SNB-CLL10038	376
2.5 Etude par fractionnement bio-guidé de la souche SNB-VECD14B	377
2.6 Etude par fractionnement bio-guidé de la souche SNB-VECD14E	378
2.7 Etude par fractionnement bio-guidé de la souche SNB-VECD15A	379
2.8 Préparation des « Metal Organic Frameworks » (MOFs).....	379
2.9 Réactions d'hémisynthèses	381
3 Essais biologiques	382
3.1 Essais antimicrobiens	382
3.1.1 Pathogènes	382
3.1.2 Mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par microdilution .	382
3.2 Evaluation biologique de l'activité insecticide	385
3.2.1 Essais larvicide	385
3.2.2 Essais sur moustiques adultes.....	387
3.3 Evaluation de l'activité cytotoxique	391
Annexes	393
Bibliographie	411

Table des illustrations

Figure 1: Diversité des espèces dans les grands groupes d'organismes.....	17
Figure 2: (A) coléoptère du genre <i>Paederus</i> (© Entomart) ; (B) Pédérine.....	24
Figure 3: (A) psylle asiatique des agrumes <i>Diaphorina citri</i> ; (B) Diaphorine	25
Figure 4: Symbiose guêpe <i>Philanthus triangulum</i> - Bactérie <i>Streptomyces</i> (A : coupe d'antenne femelle au microscope contenant la bactérie symbiotique en rouge dans les réservoirs ; B : guêpe femelle avec la bactérie <i>Streptomyces</i> au niveau des glandes antennaires ; C : antibiotiques isolés des cocons).....	26
Figure 5: Fourmi du genre <i>Apterostigma dentigerum</i> et molécules isolés de <i>Pseudonocardia</i>	27
Figure 6: Fourmi champignoniste du genre <i>Acromyrmex</i> avec bactérie <i>Streptomyces</i> visible sur la cuticule (en blanc) et métabolites produits par la bactérie	28
Figure 7 : Exemples de contamination par des champignons entomopathogènes	31
Figure 8: Modèle du processus d'infection par un champignon entomopathogène	32
Figure 9: Molécules isolées de <i>Metarizhium anisopliae</i>	33
Figure 10 : Molécules isolées de champignons du genre <i>Beauveria</i>	34
Figure 11: Vu au microscope électronique de la toxine protéique chez deux espèces de <i>Bacillus</i>	36
Figure 12: Molécules isolées des bactéries du genre <i>Xenorhabdus</i> et <i>Photorhabdus</i>	39
Figure 13: Structure de la paroi de bactéries à Gram positif (gauche) et à Gram négatif (droite).....	42
Figure 14: Antibactériens de la famille des β -lactamines (noyau β -lactame en bleu).....	43
Figure 15: Vancomycine	44
Figure 16: Antibactériens de la famille des Aminoglycosides (noyau 2-DOS en bleu)....	45
Figure 17: Antibactériens de la famille des Tétracyclines.....	46
Figure 18: Quinolones de différentes générations	47
Figure 19: Daptomycine.....	47
Figure 20: Structure chimique de la cytosine et de deux analogues fluorés, la 5-fluorocytosine et la 5-fluorouracile	48
Figure 21: Structure des trois principaux polyènes antifongiques (noyau d-mycosamine en bleu)	50
Figure 22: Structure des principaux antifongiques azolés (en haut imidazoles, en bas triazoles de première et seconde génération).....	52
Figure 23: Structure de trois échinocandines utilisées en médecine clinique	53
Figure 24: Antifongiques de la famille des allylamines et des morpholines.	54
Figure 25: Photo du papyrus Ebers	55
Figure 26: <i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> (©Manfred Ruckszio), <i>Derris elliptica</i> (©Forest and Kim Starr) et <i>Lonchocarpus nicou</i> (de gauche à droite).....	56
Figure 27: Insecticides de la famille des organochlorés.....	57
Figure 28: Insecticides de la famille des organophosphorés	58
Figure 29: Insecticides de la famille des carbamates	59
Figure 30: Insecticides de la famille des pyréthrinoïdes.....	60

Figure 31: Insecticides de la famille des Néonicotinoïdes.....	61
Figure 32: Insecticides ciblant la croissance et le développement des insectes	62
Figure 33: Molécules extraites de l'huile d' <i>Azadirachta indica</i>	64
Figure 34: Molécules isolées de bactéries du genre <i>Bacillus</i>	67
Figure 35: Zone de récolte du matériel biologique en Guyane Française	81
Figure 36: Photographie d'une partie des souches microbiennes isolées (© S.Touré)	83
Figure 37: Nombre d'isolats obtenus, par Ordre	84
Figure 38: Modèle de distribution mondial d' <i>Aedes aegypti</i> . La carte représente la probabilité d'occurrence du moustique (de 0 en bleu à 1 en rouge).....	86
Figure 39 : Arbre phylogénétique de l'ensemble des champignons isolés	96
Figure 40: Arbre phylogénétique de l'ensemble des bactéries isolées.....	96
Figure 41: Corrélations COSY et HMBC clés du composé SNB-1	123
Figure 42: Réactions de dérivatisation réalisées sur la mucorolactone.....	159
Figure 43: Processus de synthèse des esters de Mosher pour la mucorolactone	159
Figure 44: Molécules isolées du champignon <i>Isaria farinosa</i>	166
Figure 45: Photo des cultures OSMAC d' <i>Isaria farinosa</i>	219
Figure 46 : Superposition des chromatogrammes issus des extraits des cultures OSMAC.....	221
Figure 47 : Métabolites secondaires antibiotiques isolés de bactérie du genre <i>Pantoea</i>	226
Figure 48 : Dicétopipérazines isolées de la bactérie <i>Pantoea</i> SNB-VECD14B	321
Figure 49 : Corrélations COSY et HMBC clés du 2,2'-sulfonyldinaphthalène.....	322
Figure 50 : Comparaison RMN ¹ H des composés isolés de SNB-VECD11D et SNB-VECD14B (600 MHz, MeOD).....	323
Figure 51: Exemples de métabolites secondaires isolés de champignons du genre <i>Pestalotiopsis</i>	328
Figure 52 : Molécules isolées de l'extrait SNB-VECD14E.....	330
Figure 53 : Comparaison des profils métabolomiques sur HPLC des extraits AcOEt d' <i>Asaia</i> sp. à la concentration de 5 mg/mL (A) Extrait initial après isolement à partir de l'insecte hôte, (B) Extrait après repiquages successifs.	338
Figure 54 : A gauche : ensemble des réseaux moléculaires de la totalité des extraits à l'AcOEt – A droite : Réseau 1 correspondant majoritairement à <i>Pantoea</i> sp. contenant les hydroxy-acylphenylalanines isolées (clusters entourés en rouge) et des analogues potentiels (clusters cerclés en vert).	345
Figure 55 : Réseau 2 correspondant aux dicétopipérazines.....	346
Figure 56 : Réseaux 3 et 4 correspondant aux cyclodepsipeptides bioactifs des champignons des genres <i>Beauveria</i> et <i>Fusarium</i>	348
Figure 57: Schéma du protocole utilisé pour isoler les micro-organismes.....	365
Figure 58: Schéma du premier fractionnement de l'extrait SNB-VECD11D (les composés nouveaux sont encadrés en jaune)	372
Figure 59: Schéma du second fractionnement de l'extrait SNB-VECD11D.....	373
Figure 60: Schéma du fractionnement de l'extrait SNB-VECD13A (les composés nouveaux sont encadrés).....	375
Figure 61: Schéma du fractionnement de l'extrait SNB-CLL10038 (les composés nouveaux sont encadrés).....	376

Figure 62: Schéma du fractionnement de l'extrait SNB-VECD14B (les composés nouveaux sont encadrés).....	377
Figure 63: Schéma du fractionnement de l'extrait SNB-VECD14E suivant l'activité larvicide (exprimée en pourcentage de mortalité à 100 ppm pour le brut et les fractions, 10 ppm pour les molécules)	378
Figure 64: Etape de préparation et d'incorporation des molécules dans les éponges cristallines (Adapté de Fujita et al. 2013).....	380
Figure 65: Photographie de cristaux de haute et de basse qualité observés au microscope	380
Figure 66: Plan de plaque 96 puits pour la détermination des CMI par micro-dilution	383
Figure 67: Cycle de vie du moustique <i>Aedes aegypti</i>	386
Figure 68: Matériel nécessaire à la mise en place des essais de toxicité sur moustiques adultes (© Nausicaa H.)	389
Figure 69: Montage du système pour les tests d'irritations. A: non couvert ; B: système couvert prêt à l'emploi	390

Liste des tableaux

Tableau 1: Nature, cible, mode d'action et mécanisme de résistances aux principaux antifongiques utilisés chez l'Homme	72
Tableau 2 : Identification et lieu de collecte du matériel biologique	82
Tableau 3: identification des micro-organismes et activité insecticide, antimicrobienne et cytotoxicité des extraits à l'acétate d'éthyle	90
Tableau 4: Données RMN 1D et 2D relatif à la molécule SNB-1	124
Tableau 5 : Résultats des activités biologiques pour les composés isolés de la souche SNB-VECD13A	161
Tableau 6 : Résultats des activités biologiques sur micro-organismes pathogènes obtenues à partir des extraits de culture de souches seules et en co-culture	220
Tableau 7 : Données RMN 1D et 2D de la 2,2'-sulfonyldi-naphthalene	322
Tableau 8 : Activité larvicide des fractions de l'extrait SNB-VECD14E testées à 100 ppm à 24 h	329
Tableau 9 : Résultats des tests d'activité antimicrobienne et larvicide des extraits bruts de VECD15A sur différents milieux de culture	339
Tableau 10: Molécules isolées à partir de l'extrait AcOEt du champignon <i>Mucor</i> spp. SNB-VECD11D	355
Tableau 11: Molécules isolées à partir de l'extrait AcOEt du champignon <i>Mucor</i> spp. SNB-VECD13A	355
Tableau 12: Molécules isolées à partir de l'extrait AcOEt du champignon <i>Isaria farinosa</i> SNB-CLL10038	356
Tableau 13: Molécules isolées à partir de l'extrait AcOEt de la bactérie <i>Pantoea</i> spp. SNB-VECD14B	357
Tableau 14: Molécules isolées à partir de l'extrait AcOEt du champignon <i>Pestalotiopsis theae</i> SNB-VECD14E	357
Tableau 15: Milieux de culture utilisés pour réactiver les voies de biosynthèse chez <i>Asaia</i> sp.	379
Tableau 16: Identification des souches pathogènes utilisées	382
Tableau 17: CMI des composés de références utilisés (témoins positifs)	384
Tableau 18: Préparations des échantillons pour les tests larvicide	387
Tableau 19: Préparation des solutions d'imprégnation	388

Liste des abréviations

2-DOS : 2-désoxystreptamine
5-FC : 5-fluorocytosine
5-FU : 5-fluorouracile
ACh : AcétylCholine
AChE : AcétylCholine Estérase
ACN : Acétonitrile
AcOEt : Acétate d'Ethyle
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AG : Acide Gras
AmB : Amphotéricine B
ARN : Acide RiboNucléique
Bs : *Bacillus sphaericus*
Bt : *Bacillus thurigiensis*
Bti: *Bacillus thurigiensis israelensis*
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
COSY : COrrélation SpectroscopY
DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane
DMAP : 4-Diméthylaminopyridine
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EARS-Net : European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ELSD : Evaporative Light Scattering Detector
ENSFA : Ecole National Supérieure de Formation de l'Enseignement Agricole
EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations
GABA : Acide γ -aminobutyrique
GNPS : Global Natural Product Social Molecular Networking
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
HRMS : High Resolution Mass Spectrometry
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation
IPG : Institut Pasteur de Guyane
ITS : Internal transcribed spacer
KD : Knock-Down
kDa : KiloDalton
LiAlH₄ : Aluminohydrure de lithium
LiOH : Hydroxide de lithium
MeOH : Methanol
MH : Mueller Hinton
MHz : MegaHertz
MOFs : Metal Organic Frameworks
MOPS : Acide 3-(N-morpholino)-propane sulfonique)
NAG : *N*-acétyl-glucosamine
NAM : *N*-acétylmuramique
NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OP : OrganoPhosphorés

OPLS-DA : Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis
OSMAC : One Strain Many Compounds
PCA : Principal Component Analysis
PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne
PDA : Potato Dextrose Agar
PIPS: Plant-Incorporated-Protectants
RAM : Résistance Aux Antimicrobiens
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RSA : Relation Structure-Activité
SARM : Staphylococcus Aureus Resistant à la Methicilline
TEPP : TétraEthyl Pyrophosphate
TGH : Transfert de gènes horizontal
THF : Tétrahydrofurane
TMS : TetraMethylSilane
UHPLC : Ultra-High Performance Liquid Chromatography
UV : Ultra-Violet

Introduction

Le présent projet de thèse a été effectué à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette au sein de l'équipe « Métabolites de micro-organismes symbiotiques – Bioinspiration » (nouvellement « Métabolites de plantes et de micro-organismes associés : isolement synthèse et bioactivité »). L'un des projets structurant de l'équipe consiste à s'inspirer des interactions inter-espèces (plantes – micro-organismes – insectes) et des mécanismes moléculaires qui les régissent, afin de découvrir de nouveaux composés bioactifs. Ainsi, au moyen d'approches innovantes telles que l'écologie chimique, la bio-inspiration et la métabolomique, le laboratoire explore et valorise la diversité chimique des métabolites secondaires (molécule signal, de défense, etc.) impliqués dans l'établissement et l'évolution de ces relations.

La nature a toujours été un vivier important d'agents thérapeutiques encore utilisés de nos jours. L'utilisation des plantes à des fins médicinales existe depuis des millénaires et une proportion relativement importante a été étudiée à ce jour. En comparaison, les micro-organismes restent une source encore peu connue et peu exploitée de métabolites secondaires. Pourtant il a été établi dans la littérature que les micro-organismes (bactéries et champignons) et les insectes, représentent les groupes d'organismes les plus diversifiés et méconnus sur Terre (**Figure 1**). Une grande partie de ces êtres vivants n'a donc jamais été étudiée chimiquement.

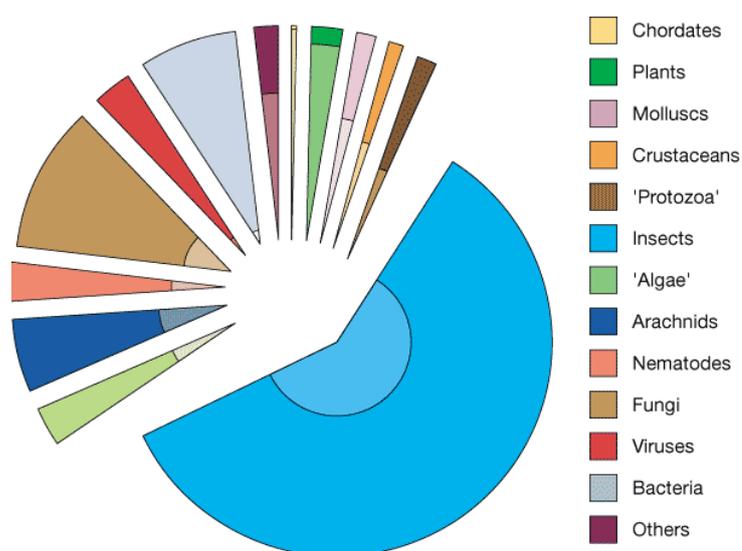


Figure 1: Diversité des espèces dans les grands groupes d'organismes. Chaque part représente le nombre d'espèces estimé pour chaque groupe. La partie plus claire de chaque part représente la proportion d'espèce formellement décrite.¹

¹ Purvis A, Hector A. Getting the measure of biodiversity. *Nature*. 2000; 405:212–219.

Les antibiotiques sont un exemple parfait de l'usage des micro-organismes comme source de métabolites bioactifs avec la découverte de la pénicilline comme point de départ d'un âge d'or de l'antibiothérapie.² L'introduction d'immunosuppresseurs tels que la cyclosporine ou la rapamycine est un autre exemple notable de l'exploitation médicinale des micro-organismes. Ces derniers sont également source de composés anti-cancéreux, anti-diabétiques, ou encore d'agents agro-sanitaires.³

En plus de leur abondance et de leur importante diversité, les micro-organismes présentent l'avantage de pouvoir être cultivés en laboratoire, potentiellement à une échelle industrielle. Cependant, il n'est pas rare de faire face à une certaine redondance dans l'isolement des souches et donc des substances naturelles qui en découlent. Pour pallier à ces contraintes et augmenter les chances de succès, de nombreuses approches intégrées sont aujourd'hui combinées. D'un point de vue technologique, des approches complémentaires en génomique, protéomique, chimie combinatoire et métabolomique contribueraient à de futurs succès.⁴ A cela s'ajoute la nécessité de diversifier les sources microbiennes en explorant de nouvelles niches écologiques telles que les profondeurs terrestres et marines, les « hot spots » de diversité, ou encore les sites de haute salinité ou acidité, qui abritent souvent des micro-organismes originaux et pouvant potentiellement produire de nouveaux composés.^{5,6} D'autres sources encore peu exploitées sont les micro-organismes associés aux plantes et lichens, aux animaux ou aux insectes.⁷ Ces environnements uniques, spécifiques et compétitifs sont une source indéniable de substances naturelles originales.⁸ En outre, il est de plus en plus admis que les métabolites produits par les grands organismes (plantes et animaux) peuvent parfois être issus de leurs organismes associés.⁹

C'est dans cette optique et avec la volonté de découvrir de nouvelles sources de composés d'intérêt pharmaceutique et/ou phytosanitaire que s'inscrit mon projet de

² Genilloud O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Nat Prod Rep.* 2017.

³ Grabley S., Thiericke R. The impact of natural products on drug discovery. In: *Drug Discovery from Nature*. S. Grabley, R. Thiericke (eds.), Springer-Berlin, Heidelberg; 1999; 3–37

⁴ Medema MH, Fischbach MA. Computational approaches to natural product discovery. *Nat Chem Biol.* 2015; 11:639–648.

⁵ Bull AT. Clean technology: industry and environment, a viable patnership ? *Biologist.* 2000; 47:61–64.

⁶ Tulp M, Bohlin L. Functional versus chemical diversity: is biodiversity important for drug discovery? *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23:225–231.

⁷ Rikkinen J, Oksanen I, et al. Lichen guilds share related cyanobacterial symbionts. *Science.* 2002; 297:357.

⁸ Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep.* 2001; 18:448–459.

⁹ Crawford JM, Clardy J. Bacterial symbionts and natural products. *Chem. Commun.* 2011; 47:7559–7566.

recherche doctoral. Dans le cas présent, les études ont été menées sur des micro-organismes entomopathogènes provenant d'insectes vivants infectés. Ces derniers ont été récoltés avant le début de la thèse par des partenaires scientifiques présent en Guyane et en Métropole (Charlotte Gourmel – Biosavane, Alexandra Magro – ENSFA et Christian Lechat – ASCOFrance).

Les micro-organismes entomopathogènes ont une action délétère sur la santé des insectes qu'ils colonisent et peuvent excréter en ce sens des composés insecticides lors du processus d'infection. D'autre part, des études ont mis en évidence la capacité des insectes à se protéger des infections microbiennes du fait de leur association avec des micro-organismes qui leur sont bénéfiques (mutualistes notamment). Il est donc raisonnable de penser que la colonisation d'un nouvel hôte par un entomopathogène nécessite pour ce dernier d'entrer en compétition avec les micro-organismes mutualistes de l'insecte. Ces interactions tripartites (insectes – mutualistes – pathogènes) engendrent donc des échanges chimiques et induisent la production de métabolites secondaires insecticides et/ou antimicrobiens.

Ainsi l'étude des interactions entre insectes et micro-organismes, et plus particulièrement les mécanismes de défense des uns vis-à-vis des autres, sont donc une source d'inspiration pour la recherche de composés bioactifs.

L'objectif du présent travail était donc d'isoler et caractériser les micro-organismes associés aux insectes, afin d'en extraire les métabolites secondaires. Nous souhaitons d'une part découvrir de nouveaux composés antimicrobiens et insecticides, et d'autre part explorer la diversité du métabolome de ces souches afin de démontrer leur potentiel rôle écologique.

Le projet a été mené en collaboration avec l'équipe « Contrôle et Adaptation des Vecteurs » de l'Institut Pasteur de Guyane ayant permis les évaluations insecticides sur le moustique *Aedes aegypti*.

Au sujet du présent manuscrit

Le présent manuscrit est rédigé sous le format d'une « thèse sur articles ». Il s'articule autour de trois parties.

La première partie sera consacrée à une étude bibliographique traitant :

- de la diversité des interactions entre insectes et micro-organismes et les molécules de signalisation impliquées dans ces relations
- des antimicrobiens actuellement disponibles sur le marché
- des insecticides actuellement employés dans la protection des cultures et/ou la lutte anti-vectorielle
- la situation actuelle face aux phénomènes de résistance aux antimicrobiens et aux insecticides

La seconde partie du manuscrit est dédiée à la présentation des résultats depuis l'isolement et l'identification des micro-organismes jusqu'à l'analyse chimiques des souches sélectionnées et de leurs métabolites. Elle se présente sous forme de publications. Au total quatre articles sont présentés, dont un est publié dans le journal *Tetrahedron Letters* (Partie 3.1). Les trois autres publications seront soumises dans les journaux suivants : *Organic Letters* (Partie 3.2), *Journal of Natural Products* (Partie 4.1) et *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (Partie 5.1).

Enfin la dernière partie du manuscrit propose une analyse transversale de l'ensemble des résultats obtenus afin d'exposer le cheminement scientifique ayant orienté nos décisions et nos recherches. Cette partie comprend également une analyse globale relative aux derniers travaux réalisés dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Professeur Jean-Luc Wolfender concernant une exploration par réseaux moléculaires du métabolome de l'ensemble des souches isolées au cours du projet.

Par souci de cohérence, la numérotation des molécules est propre à chaque article. Les molécules non sujettes à publication et présentées en résultats complémentaires possèdent une autre numérotation effectuée en fonction de leur apparition dans la partie résultat.

L'ensemble des images utilisées dans le présent manuscrit sont libres de droit ou ont fait l'objet d'une demande d'autorisation.

Etat de l'art

1 Interactions insectes – micro-organismes

Avec plus d'un million d'espèces décrites (plus que pour tous les autres groupes d'animaux combinés), les insectes sont de loin le clade animal le plus diversifié et le plus abondant sur Terre, en terme d'espèces, d'habitat et de biomasse.

Les symbioses entre insectes et micro-organismes ont été démontrées comme pouvant jouer un rôle dans les mécanismes de digestion chez l'insecte hôte.¹⁰ Des symbioses sont également impliquées dans les mécanismes de défense des insectes face à leurs prédateurs.^{11,12,13} Enfin il a été montré qu'elles contribueraient aux communications intra- et interspécifiques. En effet les micro-organismes auraient une influence sur les systèmes d'accouplement et de reproduction de leur hôte. De plus, ils auraient la capacité de réguler la pathogénicité des micro-organismes transportés chez les insectes vecteurs de maladies.¹⁴

Les relations entre insectes et micro-organismes sont gouvernées par des interactions allant du mutualisme au parasitisme.

Le terme « symbiose » a été initialement inventé par Heinrich Anton de Bary en 1879 dans sa monographie "Die Erscheinung der Symbios" (Strasbourg, 1879) comme "le vivre ensemble d'organismes différents" (Contrecas et al. 2008).

La présence d'associations tout au long de l'histoire évolutive des insectes a façonné la diversité observée dans ce groupe d'animaux. Selon les avantages pour chacun des membres de la relation, les associations symbiotiques peuvent être divisées en commensalisme, mutualisme et parasitisme (Moya et al. 2008).

*Le **parasitisme** survient lorsqu'une espèce tire un avantage de la relation tandis que l'autre est lésée par l'association. Le **commensalisme** survient lorsqu'un organisme, apparemment non pathogène, vit en association avec son hôte sans lui apporter un quelconque avantage en retour. Certains organismes commensaux peuvent être considérés comme mutualistes. Le **mutualisme** est une relation apportant un bénéfice mutuel aux deux membres (Dillon et al. 2004).*

Les concepts de mutualisme et parasitisme sont parfois difficilement définissables. De nombreux exemples illustrent l'idée selon laquelle les associations pourraient avoir débuté comme pathogènes pour ensuite évoluer vers une tolérance de l'hôte vis-à-vis de son parasite conduisant à un échange réciproque aboutissant au mutualisme.

¹⁰ Brune A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nature*. 2014; 12:168–180.

¹¹ Nirma C, Eparvier V, et al. Antifungal agents from *Pseudallescheria boydii* SNB-CN73 isolated from a *Nasutitermes* sp. termite. *J Nat Prod*. 2013; 76:988–991.

¹² Sorres J, Nirma C, et al. Tyroscherin and tyroscherin analogs from *Pseudallescheria boydii* SNB-CN85 isolated from termite *Termes* cf. *hispaniolae*. *Phytochem Lett*. 2017, 22:142–144.

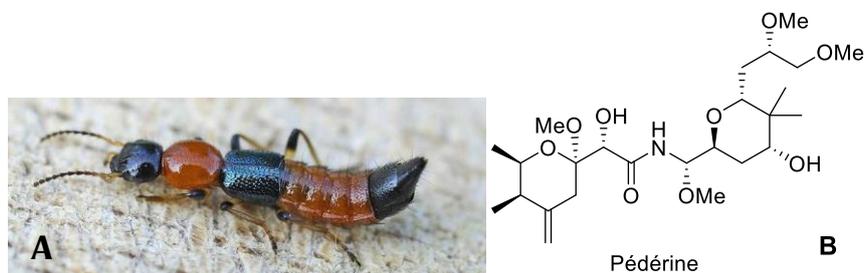
¹³ Nirma C, Eparvier V, et al. Antibacterial ilicicolinic acids C and D and ilicicolinal from *Neonectria discophora* SNB-CN63 isolated from a termite nest. *J Nat Prod*. 2015; 78:159–162.

¹⁴ Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2013; 37: 699–735.

1.1 Les relations de mutualisme

1.1.1 Les symbioses protectrices

Certains coléoptères du genre *Paederus* produisent une toxine appelée pédérine qui les protègent de prédateurs tels que les araignées (Figure 2).¹⁵ Connue depuis les années 50, ce n'est que récemment que ses origines biosynthétiques ont été découvertes.¹⁶ En effet la toxine n'est observée chez le coléoptère qu'en présence d'une gammaprotéobactérie endosymbiotique du genre *Pseudomonas*. Le séquençage du génome bactérien a alors révélé un cluster de gènes cohérent avec la biosynthèse de la pédérine.¹⁶ Ce fut la première preuve convaincante de la capacité d'un endosymbiote à produire une toxine protégeant son hôte.



Un autre exemple est celui du psylle asiatique des agrumes, *Diaphorina citri*, et sa betaprotéobactérie, *Candidatus Proffttella armatura*, qui produit un analogue de la pédérine : la diaphorine (Figure 3).¹⁷ Bien que toxique pour les cellules de mammifères, le rôle écologique de cette toxine n'est pas connu à ce jour. Toutefois il est intéressant de noter que l'insecte hôte présente un système immunitaire simplifié en comparaison d'autres insectes.¹⁸ La diaphorine pourrait donc contribuer à la protection de l'insecte en complétant son système de défense.

¹⁵ Kellner RL, Dettner K. Differential efficacy of toxic pederin in deterring potential arthropod predators of *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. *Oecologia*. 1996; 107:293–300.

¹⁶ Piel J. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; 99:14002–14007.

¹⁷ Nakabachi A, Ueoka K, et al. Defensive bacteriome symbiont with a drastically reduced genome. *Curr Biol*. 2013; 23:1478–1484.

¹⁸ Arp AP, Hunter WB, et al. Innate immune system capabilities of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Front Physiol*. 2016; 7:417–418.

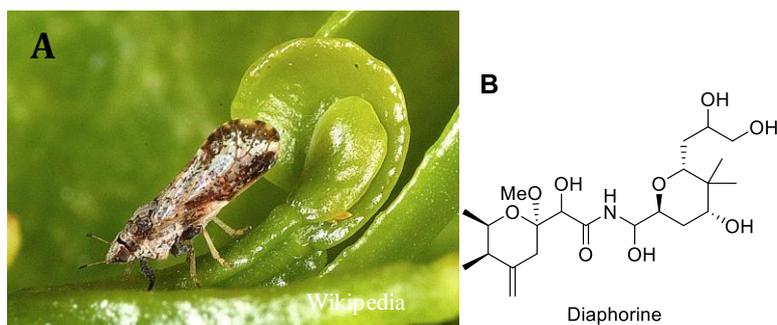


Figure 3: (A) psylle asiatique des agrumes *Diaphorina citri* ; (B) Diaphorine

Le cycle de vie des insectes ne favorise pas la transmission des micro-organismes entre les différentes générations. En effet, chez bon nombre d'insectes, les femelles abandonnent les œufs et le seul comportement social est l'accouplement des spécimens adultes. Cependant, les insectes sociaux (termites, fourmis, abeilles) et certaines espèces de guêpes et blattes montrent des comportements permettant les transmissions directes et/ou indirectes, favorisant ainsi l'évolution et l'établissement de symbiotes spécialisés.¹⁹

La guêpe solitaire *Philanthus triangulum* en est un parfait exemple. Elle tapisse son nid de bactéries du genre *Streptomyces* qu'elle cultive dans des glandes présentes au niveau de ses antennes. Les larves assimilent les bactéries et les distribuent au sein de leurs cocons. La présence de ces bactéries a été décrite comme améliorant le développement larvaire en éliminant les champignons parasites.²⁰ En effet ces bactéries produisent un cocktail de composés antimicrobiens à large spectre d'activité, incluant la streptochlorine et plusieurs piéricidines.²¹ L'effet complémentaire de ces composés est un parfait exemple de prophylaxie combinée dans un contexte écologique (**Figure 4**).

¹⁹ Martinson VG, Moy J, et al. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honey bee worker. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78:2830–2840.

²⁰ Kaltenpoth M, Gottler W, et al. Symbiotic Bacteria Protect Wasp Larvae from Fungal Infestation. *Curr. Biol.*, 2005; 15:475–479.

²¹ Kroiss J, Kaltenpoth M, et al. Symbiotic *Streptomyces* provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring. *Nat Chem Biol.* 2010; 6:261–263.

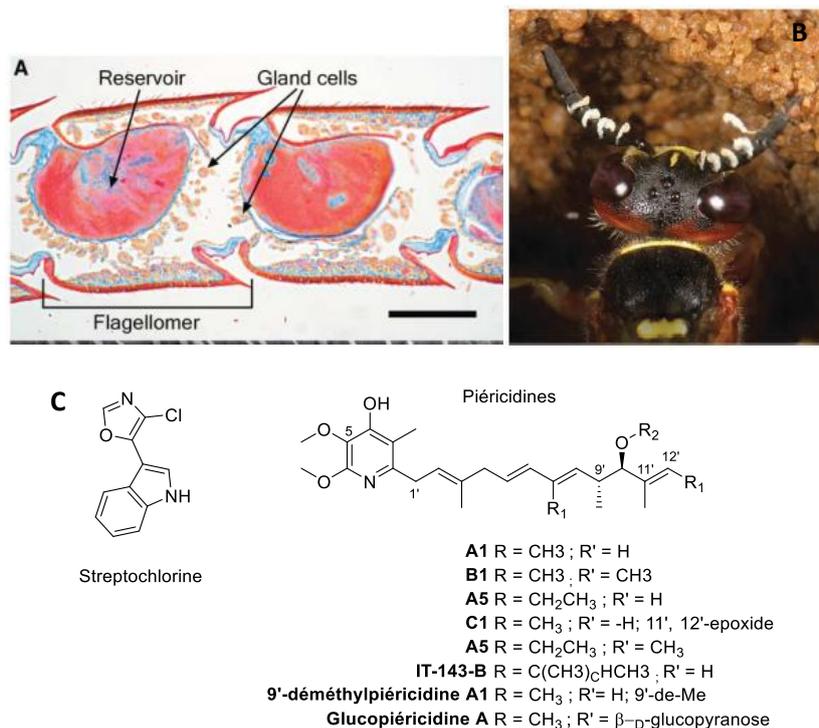


Figure 4: Symbiose guêpe *Philanthus triangulum* - Bactérie *Streptomyces* (A : coupe d'antenne femelle au microscope contenant la bactérie symbiotique en rouge dans les réservoirs ; B : guêpe femelle avec la bactérie *Streptomyces* au niveau des glandes antennaires ; C : antibiotiques isolés des cocons)^{20,21}

Les études des interactions mutualistes se fondent généralement sur l'idée que ces associations symbiotiques sont des systèmes bipartites, avec deux membres interagissant isolément des autres organismes. Il n'en est rien puisque les nombreuses études menées sur ces associations ont décrits des mutualismes très évolués faisant intervenir plusieurs acteurs.

Les fourmis champignonnistes, parmi lesquelles on retrouve les fourmis du genre *Atta* « coupeuses de feuilles », vivent en symbiose stricte avec un champignon basidiomycète qu'elles cultivent dans des chambres souterraines. Elles lui apportent le substrat nécessaire à son développement et s'en nourrissent en retour.²² Bien que ce mutualisme entre fourmis et champignons fût longtemps considéré comme impliquant deux acteurs seulement, l'équipe de Currie a mis en évidence la présence d'un mutualiste bactérien et d'un parasite spécifique.^{23,24} L'association des fourmis avec cette bactérie remonterait à

²² Caldera EJ, Poulsen M, et al. Insect symbioses: a case study of past, present, and future fungus-growing ant research. *Env Ent.* 2009; 38:78–92.

²³ Currie CR. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia.* 2001; 128:99– 106.

²⁴ Currie CR. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annu Rev Micro.* 2001; 55:357–380.

des dizaines de millions d'années.²⁵ En effet, les jardins des fourmis champignonnistes sont fréquemment infectés par un champignon parasite spécialisé et virulent du genre *Escovopsis*.²⁶ On le retrouve uniquement dans les jardins et déchets de ces fourmis dont il est capable de décimer une colonie entière. Pour s'en protéger, ces dernières peuvent compter sur une bactérie du genre *Pseudonocardia*, présente sur la cuticule des insectes.²⁷ Cette bactérie lui est bénéfique puisqu'elle produit des composés antimicrobiens spécifiquement dirigés vers le champignon parasite. En effet, il a été démontré que les métabolites secondaires produits par la bactérie *Pseudonocardia* sp. inhibaient le développement du champignon parasite *Escovopsis* sp., sans effet délétère sur le champignon cultivé par les fourmis.²⁷ Ainsi elles participent à un système complexe de symbiose multipartite impliquant plusieurs espèces microbiennes.

Parmi les composés bioactifs isolés de *Pseudonocardia* on retrouve la dentigérumycine et la selvamicine, deux antifongiques produits par la bactérie associée aux fourmis *Apterostigma dentigerum* (Figure 5).²⁸ La selvamicine présente un mécanisme d'action différent des autres polyènes antifongiques, elle est actuellement évaluée pour une utilisation clinique.²⁹

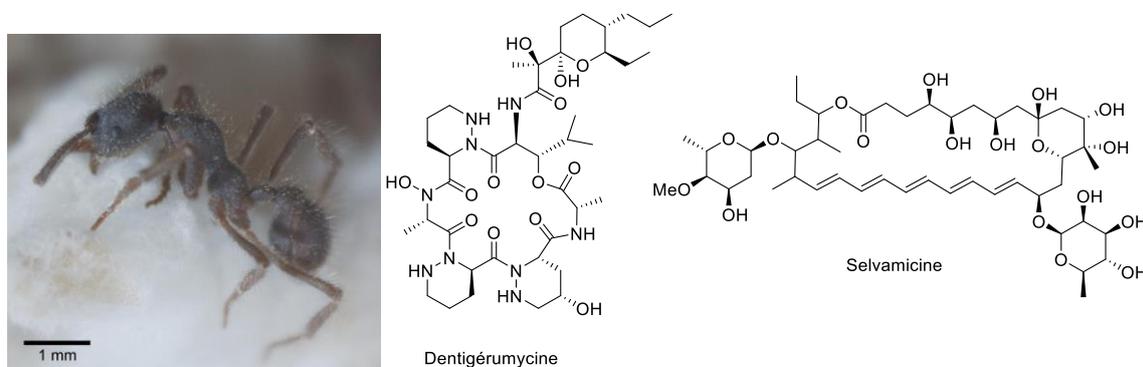


Figure 5: Fourmi du genre *Apterostigma dentigerum* et molécules isolés de *Pseudonocardia*²⁸

La production d'antifongiques a également été décrite chez des actinobactéries telles que des *Streptomyces* associés à des fourmis champignonnistes. Ainsi des souches

²⁵ Currie CR, Poulsen M, et al. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science*. 2006; 311: 81–83.

²⁶ Currie C, Mueller UG, et al. The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:7998–8002.

²⁷ Currie CR, Scott JA, et al. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*. 1999; 398: 701–704.

²⁸ Oh DC, Poulsen M, et al. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. *Nat Chem Biol*. 2009; 5:391–393.

²⁹ Van Arnem EB, Ruzzini AC, et al. Selvamicin, an atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113:12940–12945.

isolées de fourmis du genre *Acromyrmex* produisent la candicine et différentes antimycines (Figure 6).^{30,31}

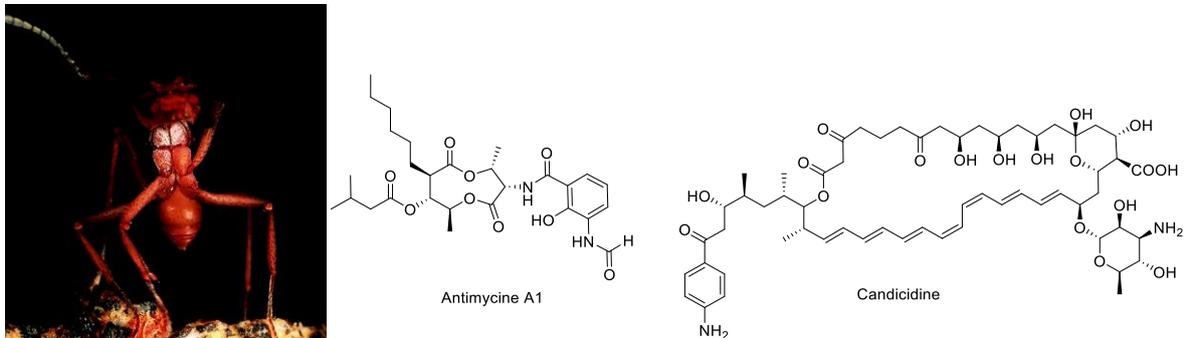


Figure 6: Fourmi champignonniste du genre *Acromyrmex* avec bactérie *Streptomyces* visible sur la cuticule (en blanc) et métabolites produits par la bactérie²⁷

1.1.2 Les symbioses nutritives

Les insectes se sont adaptés à une vaste gamme de niches écologiques où ils prospèrent souvent dans des régimes pauvres en nutriments ou réfractaires. Par conséquent, les symbioses nutritionnelles avec des micro-organismes modifiant les nutriments alimentaires sont répandues. Ces relations persistantes et durables contribuent au mode de vie de l'hôte.¹⁴

Les symbioses nutritives (trophobiose, du grec trophê = nourriture et de -biose pour symbiose) sont particulièrement bien documentées chez les insectes. Ceux se nourrissant de matière végétale, en particulier de bois (xylophage), peuvent abriter des communautés microbiennes intestinales impliquées dans la dégradation de la cellulose.³² Ces communautés microbiennes sont très diversifiées et spécifiques, s'adaptant au régime de l'hôte.

Les termites se nourrissent de matières végétales et contribuent ainsi de manière substantielle au cycle mondial du carbone.³³ Les espèces de termites inférieures, considérées comme ayant un mode de vie ancestral, se nourrissent presque

³⁰ Barke J, Seipke RF, et al. A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biol.* 2010; 8:109.

³¹ Seipke RF, Barke J, et al. A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS One.* 2011; 6:e22028.

³² Anand AAP, Vennison SJ, et al. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *J Insect Sci.* 2010; 10:107.

³³ Wong LJ, H'ng PS, et al. Termite digestome as a potential source of symbiotic microbiota for lignocelluloses degradation: a review. *Pak J Bio Sci.* 2014; 17:956–963.

exclusivement de bois. Elles vivent en symbiose avec des protistes et bactéries intestinales.³³ Les travaux de Cleveland au début des années 1920 ont mis en évidence le caractère obligatoire de ces associations, les termites ne pouvant survivre en l'absence de leur microbiote intestinal.^{34,35}

Chaque espèce de termite abrite une communauté intestinale microbienne hautement spécifique, composée de plusieurs centaines d'espèces microbiennes.³⁶ Ces micro-organismes jouent un double rôle mutualiste pour leur hôte. Tout d'abord, ils contribuent à la digestion de la lignocellulose et produisent des niveaux élevés d'acétate, ce qui représente la principale source de carbone pour leur hôte.³⁷ Deuxièmement, ils fournissent à leur hôte de l'azote, élément généralement déficient dans la matière végétale en décomposition.³⁸

Les espèces de termites supérieures, appartenant à la famille des Termitidae incluent dans leur alimentation les plantes fourragères, la litière, l'herbe, le sol et le lichen, en plus du bois.³⁹ Ce mode de nutrition induit des changements conséquents au niveau du microbiote intestinal et suggère de nouvelles fonctionnalités dans le processus de digestion. Les termites supérieurs sont capables de digérer par eux-mêmes la cellulose du bois grâce à des enzymes produites dans leur tube digestif.³³ On retrouve aussi dans cette famille des espèces champignonnistes. Ces dernières ont la capacité de construire un « jardin fongique » au sein de la termitière.⁴⁰ Le jardin est construit à partir de matériel végétal partiellement digéré, qui sera dégradé par le champignon. Les ouvrières peuvent ensuite se nourrir du champignon qui leur apporte de surcroît les enzymes nécessaires pour finaliser la digestion de la cellulose.³³

³⁴ Breznak JA, Brune A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu Rev Entomol.* 1994; 39:453–487.

³⁵ Tokuda G, Watanabe H. Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. *Biol Lett.* 2007; 3:336–339.

³⁶ Hongoh Y. Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010; 74: 1145–1151.

³⁷ Warnecke F, Luginbühl P, et al. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature.* 2007; 450: 560–565.

³⁸ Breznak JA, Brill WJ, et al. Nitrogen fixation in termites. *Nature.* 1973; 244:577–580.

³⁹ Inward DJG, Vogler AP, et al. A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. *Mol Phylogenet Evol.* 2007; 44:953–967.

⁴⁰ Mueller UG, Gerardo NM, et al. The evolution of Agriculture in Insects. *Ann Rev Ecology, Evol, System.* 2005;36:563–595.

1.2 Les relations de parasitisme : les micro-organismes entomopathogènes

Les relations entre micro-organismes et insectes ne sont pas toujours bénéfiques. Certaines communautés microbiennes peuvent être parasites et se développer aux dépens de leur hôte, pouvant conduire à la mort de ce dernier. Ces micro-organismes pathogènes sont appelés entomopathogènes.

Les micro-organismes entomopathogènes sont une composante importante et répandue dans l'écosystème terrestre. On ne les retrouve pas exclusivement dans les lieux d'habitat de leurs cibles. Certaines espèces se retrouvent pratiquement partout sur Terre, également au sein d'environnements extrêmes.⁴¹

Nous nous focaliserons dans cette partie sur les entomopathogènes fongiques et bactériens.

1.2.1 Les champignons entomopathogènes

Les champignons entomopathogènes représentent un vaste groupe hétérogène. Ils se répartissent en 700 espèces appartenant approximativement à 100 ordres, mais beaucoup appartiennent aux ordres des Entomophthorales et des Hypocréales.⁴²

En tant que parasites, les champignons entomopathogènes infectent un large éventail d'insectes hôtes (**Figure 7**). Ils peuvent infecter leurs hôtes à tous les stades de développement: œufs, larves, nymphes et adultes. Au sein d'une population d'insectes, ils peuvent être transmis de trois façons : horizontalement (au sein d'une même génération par des individus infectés), verticalement (entre générations) ou être déplacés par des vecteurs. Cette troisième méthode joue un rôle important dans la dissémination des champignons vers de nouveaux habitats.⁴³

Le cycle de vie des champignons entomopathogènes comprend une phase parasite (de l'infection à la mort) et une phase saprophyte (après la mort). Le processus d'infection passe par plusieurs étapes :

⁴¹ Vega FE, Meyling NV, et al. Fungal entomopathogens. In: *Insect Pathology*. Ed. Fernando E. Vega and Harry K. Kaya. 2012. p171–220

⁴² Augustyniuk-Kram A, Kram KJ. Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (Review). In: *Forest Ecosystems – More than Just Trees*. Ed. Juan A. Blanco. 2012. p265–294.

⁴³ Fuxa JR, Tanada Y. *Epizootiology of insect diseases*. Wiley-Interscience. 1987. 576p.

- adhésion des spores fongiques à la cuticule de l'insecte,
- pénétration de la cuticule par le tube germinatif,
- développement du champignon au sein de l'hôte,
- colonisation de l'hémocœle par les hyphes.



Figure 7 : Exemples de contamination par des champignons entomopathogènes⁴¹

Les spores des champignons entomopathogènes sont habituellement couvertes de mucus composés de protéines et de glucanes, ce qui facilite leur attachement à la cuticule de l'insecte. Chez plusieurs champignons entomopathogènes les spores en germination produisent des structures spécialisées appelées appressoria. L'appressorium est responsable de la liaison des spores à la cuticule. Le processus de pénétration de la cuticule est le résultat de la pression mécanique et de l'activité enzymatique du tube germinatif. L'étape de pénétration s'accompagne de la sécrétion de lipases, protéases et chitinases. La mort de l'insecte provient habituellement des dommages mécaniques causés par la croissance du mycélium à l'intérieur, et/ou des toxines produites et libérées par les agents pathogènes.⁴² Après la mort de l'hôte, le champignon colonise le cadavre et produit des spores durant 2 à 3 jours (Figure 8).

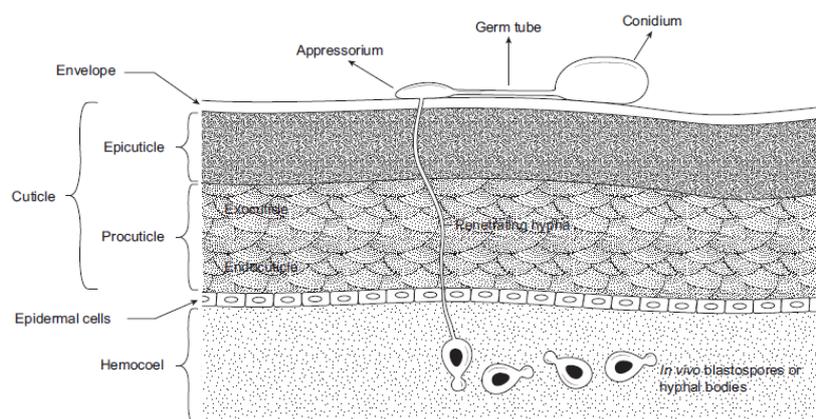


Figure 8: Modèle du processus d'infection par un champignon entomopathogène

1.2.2 Métabolites bioactifs isolés de champignons entomopathogènes

Bien que la pathogénicité des champignons entomopathogènes dérive d'une action mécanique, ces derniers produisent également des métabolites contribuant à leur succès écologique.

Les genres *Beauveria* et *Metarhizium* ont été particulièrement bien étudiés pour leur valorisation en agriculture. Pourtant, de récentes analyses comparatives de leurs génomes ont montré que seule une faible proportion de métabolites a été identifiée par rapport à l'ensemble du génome associé à la production de métabolites secondaires. Ainsi, à ce jour, de nombreux métabolites de ces champignons restent à découvrir.⁴⁴

Chez *Metarhizium anisopliae*, un des plus importants groupes de métabolites secondaires est celui des hexadepsipeptides appelés destruxines. Ils sont composés d'un α -hydroxy acide et de 5 résidus acides aminés et présentent une large gamme d'activités biologiques, telles qu'insecticide, cytotoxique, ou encore antibiotique.⁴⁵ La sécrétion des destruxines est corrélée à la virulence fongique et à l'activité insecticide. L'injection, l'ingestion, ou l'application topique de ces composés entraîne une paralysie tétanique chez de nombreux insectes. Cela est dû à l'ouverture de canaux calciques et aux phénomènes de dépolarisation membranaire qui en résultent.⁴⁶ Une autre étude décrit les heptapeptides cycliques appelés sérinocyclines, isolés des conidies du même

⁴⁴ Gibson DM, Donzelli DGG, et al. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. *Nat Prod Rep.* 2014; 31:1287–1305.

⁴⁵ Pedras MS, Zaharia LI, et al. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry.* 2002; 59:579–596.

⁴⁶ Beemelmans C, Guo H, et al. Natural products from microbes associated with insects. *Beilstein J Org Chem.* 2016; 12:314-327.

champignon et contenant de nombreux acides aminés non protéinogènes. D'autres *Metarhizium* produisent également des cytochalasines⁴⁷, myroridines⁴⁸, swainsonine⁴⁹, parmi de nombreux autres métabolites (Figure 9).

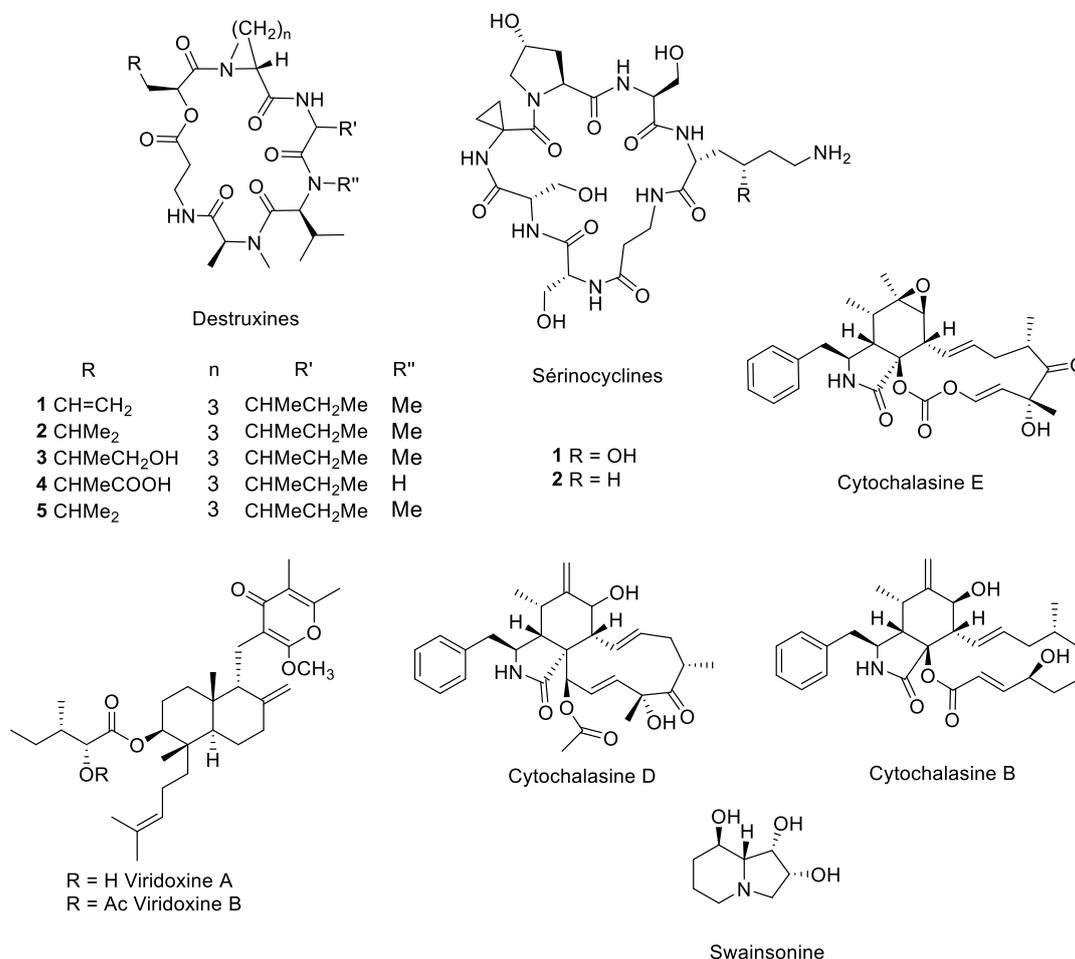


Figure 9: Molécules isolées de *Metarhizium anisopliae*

Les champignons du genre *Beauveria* sont quant à eux connus pour les différents cyclodepsipeptides qu'ils produisent (Figure 10). Le plus connu est la beauvéricine, isolée d'une culture liquide de *Beauveria* sp. Ces composés peuvent être considérés comme des antibiotiques ionophores du fait de leur interaction avec les canaux sodiques et potassiques, altérant ainsi les membranes cellulaires.⁵⁰ D'autres composés de la même

⁴⁷ Aldridge DC, Turner WB. Structures of cytochalasin C and cytochalasin D from *Metarhizium anisopliae*. *J Chem Soc.* 1969; 6:923–928.

⁴⁸ Kondo S, Meguriya N, et al. K-582, a new peptide antibiotic. *Int. J. Antibiot.* 1980; 33:533–542.

⁴⁹ Patrick M, Adlard MW. Production of an indolizidine alkaloid, swainsonine by the filamentous fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol Lett.* 1993; 15:997–1000.

⁵⁰ Ngoka LCM, Gross ML, et al. Sodium-directed selective cleavage of lactones: a method for structure determination of cyclodepsipeptides. *Int J Mass Spectrom.* 1999; 182/183:289–298.

famille sont les beauvérolides, bassianolides, beauvériolides et bassiatines. L'oosporéine, dérivé rouge de la 1,4-dibenzoquinone a été identifié pour la première fois dans les années 1960 et présente une activité antibiotique, antivirale, antifongique et insecticide.^{51,52,53,54,55} La production d'oosporéine par *B. bassiana* corrèle avec sa virulence car il inhibe le système immunitaire de l'insecte, facilitant ainsi sa propagation.⁵⁶

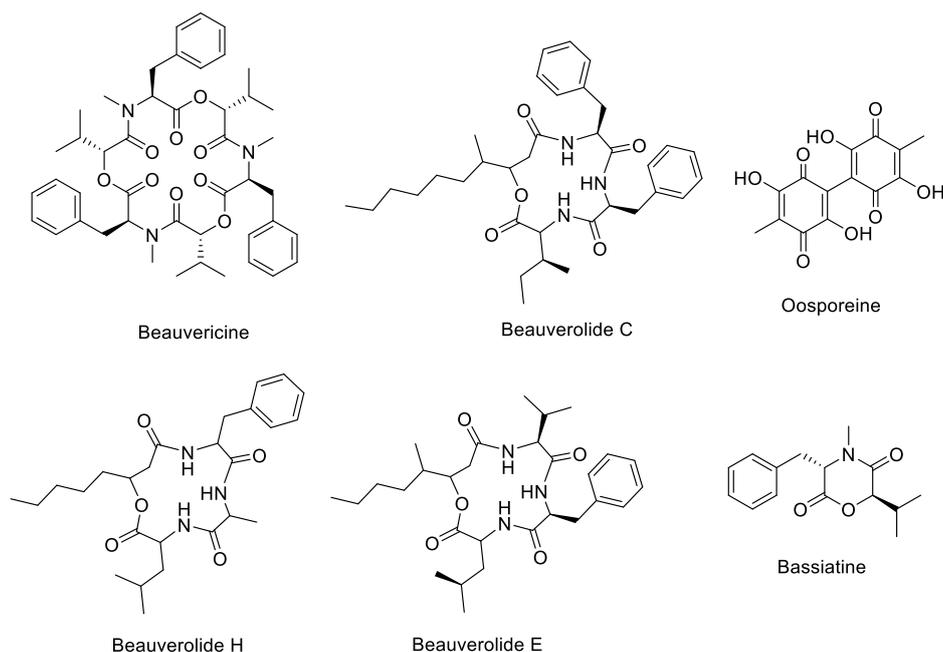


Figure 10 : Molécules isolées de champignons du genre *Beauveria*

Les champignons du genre *Beauveria* ne sont pas les seuls à produire ces composés. Les bassianolides sont produits par le champignon *Verticillium lecanii*⁵⁷, les beauvérolides

⁵¹ Vining LC, Kelleher WJ, et al. Oosporein production by a strain of *Beauveria bassiana* originally identified as *Amanita muscaria*. *J Microbiol.* 1962; 8:931–933.

⁵² Brewer D, Jen WC, et al. The antibacterial activity of some naturally occurring 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinones. *Can J Microbiol.* 1984; 30:1068–1072.

⁵³ Terry BJ, Liu Wc, et al. Inhibition of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase by the natural product oosporein. *J Antibiot.* 1992; 45:286–288.

⁵⁴ Nagaoka T, Nakata K, et al. Antifungal activity of oosporein from antagonistic fungus against *Phytophthora infestans*. *Z Naturforsch.* 2004; 59:302–304.

⁵⁵ Amin GA, Youssef NA, et al. Assessment of insecticidal activity of red pigment produced by the fungus *Beauveria bassiana*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010; 26:2263–2268.

⁵⁶ Feng P, Shang Y, et al. Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2015; 112:11365–11370.

⁵⁷ Suzuki A, Kanaoka M, et al. Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Tet. Lett.* 1977; 25:2167–2170.

par *Isaria fumosorosea*⁵⁸ et les beauvéricines sont produites par les genres *Cordyceps*, *Isaria* et *Fusarium*.^{59,60}

1.2.3 Les bactéries entomopathogènes

Pour être pathogène, une bactérie doit pouvoir pénétrer à l'intérieur de son hôte et échapper à son système immunitaire. Afin de s'établir de manière durable et coloniser l'insecte, elle doit altérer sa physiologie, notamment par la production de toxines.⁶¹

Des barrières physiques et chimiques empêchent les agents pathogènes d'envahir ou d'endommager le corps de l'insecte. La cuticule externe, le péristaltisme intestinal et la membrane péritrophique (couche interne de l'intestin moyen de l'insecte) sont des exemples de barrières physiques. A cela s'ajoute les principales défenses chimiques que sont le pH de l'appareil gastro-intestinal, les protéases, les peptides antimicrobiens, les récepteurs cellulaires du système immunitaire et le microbiote intestinal.⁶¹

Les bactéries du genre *Bacillus* sont bien connues et étudiées pour leur caractère pathogène. Alors que *Bacillus cereus* et *B. anthracis* sont des pathogènes humains, *B. thuringiensis* (*Bt*) est un pathogène d'insecte, communément utilisé comme agent de protection des cultures, contre les insectes appartenant aux ordres des Lépidoptères, Diptères et Coléoptères.⁶² Bien que très étudiée l'écologie de *B. thuringiensis* est encore partiellement énigmatique. Omniprésente dans les sols, on la retrouve également dans d'autres niches écologiques (rhizosphère, tissus végétales, etc.).⁶³ C'est une bactérie à Gram positif, anaérobie facultatif qui présente la particularité de produire une toxine protéique durant la phase stationnaire de croissance et la sporulation (**Figure 11**). Il s'agit d'une classe de protéine appelé δ -endotoxine, divisée en deux familles : Cry et Cyt codées par les mêmes gènes.⁶⁴

⁵⁸ Jegerov A, Sedmera P, et al. Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry*. 1994; 37:1301–1303.

⁵⁹ Logrieco A, Moretti A, et al. Beauvericin production by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64:3084–3088.

⁶⁰ Luangsa-ard JJ, Berkaew P, et al. A beauvericin hot spot in the genus *Isaria*. *Mycol Res*. 2009; 13:1389–1395.

⁶¹ Vallet-Gely I, Lemaitre B, et al. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nat Rev*. 2008; 6:302–313.

⁶² Lecadet MM, Frachon E, et al. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol*. 1999; 86:660-672.

⁶³ Argôlo-Filho RC, Loguercio LL. *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. *Insects*. 2014; 5:62-91.

⁶⁴ Schnepf E, Crickmore N, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62:775-806.

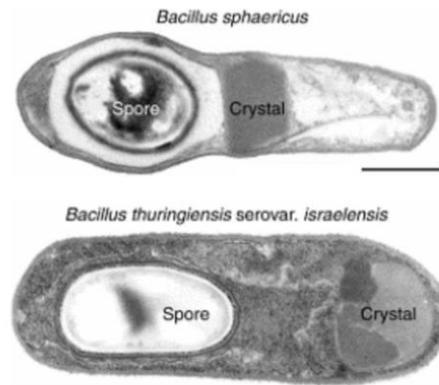


Figure 11: Vu au microscope électronique de la toxine protéique chez deux espèces de *Bacillus* ¹⁵⁷

Les protéines Cry possèdent trois domaines. Le premier est responsable de l'insertion de la toxine dans la membrane intestinale de l'hôte et la formation de pores, le second joue un rôle dans la sélectivité et est responsable de la liaison toxines-récepteurs. Enfin le dernier domaine permet de préserver l'intégrité structurelle de la toxine.⁶⁵

L'un des plus grands avantages des toxines Cry est leur haute spécificité vis-à-vis de l'hôte cible. Sans effet significatif sur les organismes vertébrés ou invertébrés non ciblés, ces toxines constituent un agent de choix dans les approches de contrôle biologique.

Le processus d'infection par *B. thuringiensis* se traduit par différentes étapes. Après ingestion de la toxine, cette dernière se solubilise dans le pH alcalin de l'intestin puis est activée par l'action de protéases clivant la prototoxine en petits peptides.⁶⁶ Une fois fixées aux récepteurs spécifiques de l'intestin, les toxines s'insèrent dans les membranes en formant des pores. Suite à la destruction des cellules par lyse osmotique, l'insecte va cesser de se nourrir et mourir des suites de l'infection.⁶⁶

La seconde endotoxine Cyt a besoin d'un récepteur membranaire de poids compris entre 25 et 28 kDa, différents des toxines Cry. C'est une toxine cytolytique (hémolytique), hydrophobe.⁶⁶ Le mécanisme d'action est encore mal compris mais semble se passer de deux manières selon la concentration de toxines. A faible dose, elle entraîne la formation de pores dans les cellules membranaires. A forte dose, leur affinité avec les lipides conduit à des désordres cellulaires, responsables de la mort.⁶⁷

⁶⁵ Xu C, Wang BC, et al. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins* (Basel). 2014; 6:2732–2770.

⁶⁶ Bravo A, Gill SS, et al. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 2007;49:423–435.

⁶⁷ Butko P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69:2415-2422.

Parmi les bactéries entomopathogènes on retrouve les bactéries du genre *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* (famille des *Enterobacteriaceae*) qui sont engagées dans des associations mutualistes avec les nématodes entomopathogènes des genres *Steinerm*a et *Heterorhabditis* respectivement.^{68,69} Les bactéries sont transportées par le stade juvénile du nématode infectant ainsi les insectes au travers d'ouvertures naturelles telles que la bouche, l'an

us ou les spiracles (orifices respiratoires au niveau de la peau).⁷⁰ Les bactéries sont ensuite libérées par le nématode dans l'hémocœle de l'insecte et conduisent à sa mort en 48 heures.⁷¹ Le nématode poursuit sa croissance et se reproduit en se nourrissant des tissus morts et des bactéries.⁷² Durant leur cycle de vie complexe, les bactéries doivent tuer l'insecte mais également faire face aux nombreux autres micro-organismes. Ces derniers sont des compétiteurs directs et résident sur la cuticule du nématode et dans l'intestin de l'hôte. *Photorhabdus luminescens* spp. *Laumondii* TT01 fut la première souche du genre à être complètement séquencée.⁷³ Ainsi plusieurs gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse de métabolites secondaires ont été mis en évidence rapprochant *Photorhabdus* des bactéries du genre *Streptomyces*, bien connus comme producteurs de métabolites secondaires bioactifs.

Enfin *Pseudomonas entomophila*, qui est une bactérie du sol a également été décrite comme entomopathogène.⁷⁴ Le premier isolat fut identifié en 2005, sur un individu *Drosophila melanogaster* à Calvaire (Guadeloupe), lors d'une étude visant à identifier les pathogènes de drosophile. Il fut alors nommé L48T.⁷⁵ Après ingestion par l'insecte, cette bactérie fut capable d'activer le système immunitaire des stades adultes et larvaires entraînant à haute dose une destruction importante au niveau intestinal.⁷⁵ La souche appartenant au genre *Pseudomonas* fut donc nommée *Pseudomonas entomophila* du fait de son activité entomopathogène. L'étude du génome bactérien a montré de nombreux

⁶⁸ Klassen JL. Microbial secondary metabolites and their impacts on insect symbioses. *Curr Opin Insect Sci.* 2014; 4:15–22.

⁶⁹ Challinor VL, Bode HB. Bioactive natural products from novel microbial sources. *Ann NY Acad Sci.* 2015; 1354:82–97.

⁷⁰ Contreras MS, Vlisidou I. The Diversity of Insect-bacteria Interactions and its Applications for Disease Control.

⁷¹ Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Prod Rep.* 2009; 26:338–362.

⁷² Goodrich-Blair H, Clarke DJ. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Mol Microbiol* 2007; 64:260-268.

⁷³ Duchaud E, Rusniok C, et al. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nat Biotechnol.* 2003; 21:1307-1313.

⁷⁴ Vodovar N, Vallenet D, et al. Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat Biotechnol.* 2006; 24:673-679.

⁷⁵ Vodovar N, Vinals M, et al. *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:11414–11419.

gènes permettant à *P. entomophila* de s'adapter à plusieurs sources de carbone. Cela suggère que cette bactérie possède un métabolisme versatile, et qu'elle peut donc survivre dans divers milieux (sols, rhizosphère, eau, etc.).⁷⁶

1.2.4 Métabolites bioactifs isolés de bactéries entomopathogènes

Près de 6% du génome des bactéries du genre *Photorhabdus* est dédié à la biosynthèse de métabolites secondaires.⁷⁷ En 1959, Dutsky émettait les premières observations sur la possible production d'antibiotiques par ces bactéries entomopathogènes pour lutter contre les micro-organismes hostiles aux nématodes, et prévenir la putréfaction du cadavre d'insecte.⁷⁸ Deux décennies plus tard, l'exploration de la diversité chimique des genres *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* a permis de mettre en lumière la production de nombreuses classes de métabolites par ces deux bactéries.⁷⁹ Parmi ces composés on retrouve des insecticides, antiparasitaires, antibiotiques, antifongiques et des antioxydants.⁶⁹ Ces métabolites incluent des peptides cycliques et linéaires, des dérivés de stylbènes, d'antraquinones, de furanes, ainsi que des dérivés phénoliques parmi d'autres composés (**Figure 12**).⁶⁹

Alors que les stylbènes sont des métabolites typiques de plantes, *Photorhabdus* est le seul à en produire en dehors du règne végétal.⁸⁰ Ils ont été décrits comme multifonctionnels, avec une activité antimicrobienne sur les bactéries à Gram positif et les champignons.⁸¹ Ils inhiberaient également la phénol oxydase impliquée dans le système immunitaire des insectes, et seraient de plus des molécules de signal pour le développement des nématodes.^{82,83}

⁷⁶ Dieppois G, Opota O, et al. 2015. *Pseudomonas entomophila*: a versatile bacterium with entomopathogenic properties. In: Ramos JL, Goldberg J, Filloux A. Ed. *Pseudomonas*. Springer, Dordrecht

⁷⁷ Chaston JM, Suen Garret, et al. The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* : convergent lifestyles from divergent genomes. *PLoS One*. 2011; 6:e27909.

⁷⁸ Dutsky SR. Insect Microbiology. *Adv App Microbiol*. 1959; 1: 175–200.

⁷⁹ Poinar Jr, GO, et al. isolation of detective bacteriophages from *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *IRCS Med Sci*. 1980; 8:141.

⁸⁰ Joyce SA, Brachmann AO, et al. Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2008; 47:1942–1945.

⁸¹ Li J, et al. Identification of two pigments and a hydroxy stilbene antibiotic from *Photorhabdus luminescens*. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 61:4329–4333.

⁸² Joyce SA, Brachmann AO, et al. Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. *Angew Chem Int Ed*. 2008 ; 47:1942-1945.

⁸³ Eleftherianos I, Boundy S, et al. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:2419-2424.

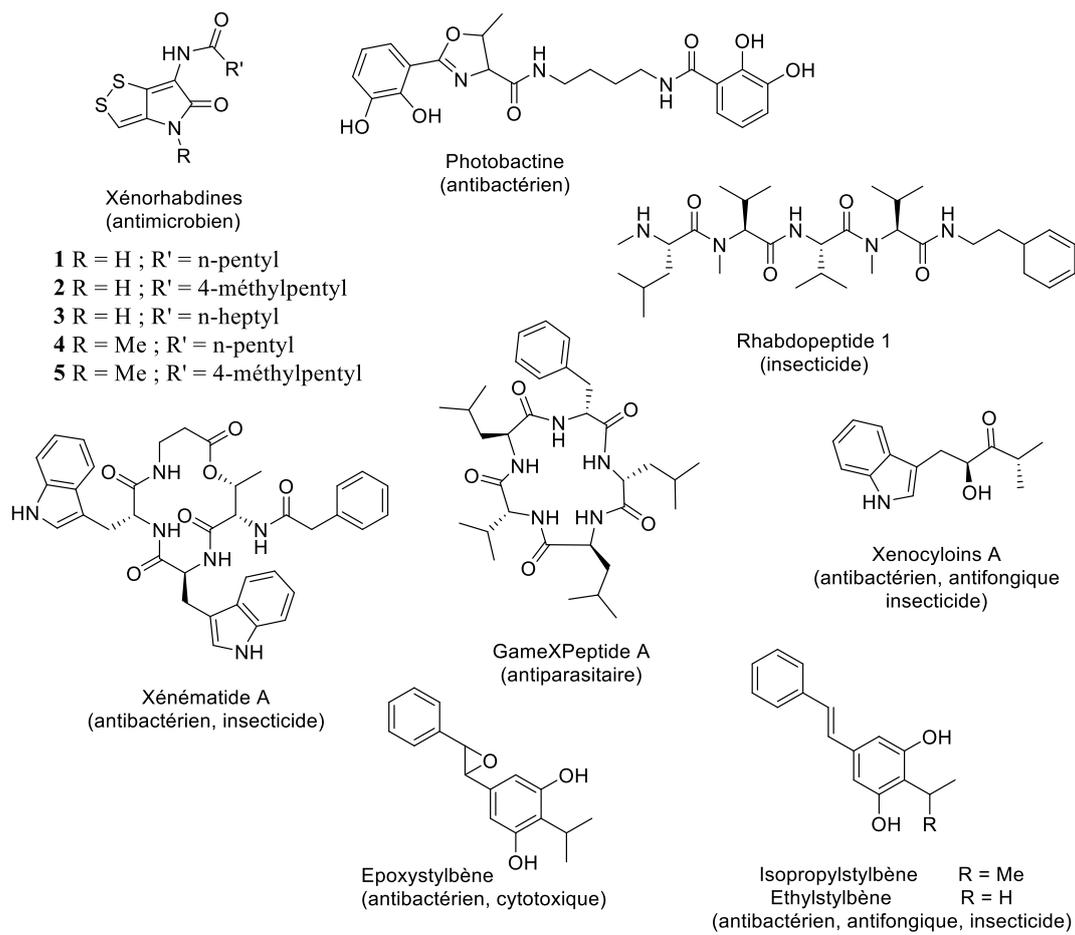


Figure 12: Molécules isolées des bactéries du genre *Xenorhabdus* et *Photorhabdus*

Cette brève étude bibliographique montre la diversité et la complexité des interactions pouvant survenir entre insectes et micro-organismes. Qu'elles soient bénéfiques ou délétères, ces interactions sont fréquentes dans la nature et découlent d'une co-évolution entre ces deux groupes d'organismes. Elles sont régulées par un ensemble de médiateurs chimiques potentiellement valorisables pour la santé humaine.

2 Les antimicrobiens actuels

Jusqu'au début du XXe siècle, les infections par les micro-organismes tels que les bactéries, les champignons, les parasites ou les virus étaient la principale cause de mortalité humaine.⁸⁴ L'incidence de ces infections était plus importante dans les pays disposant de peu de ressources où les conditions sanitaires étaient parfois médiocres.⁸⁵

Découverte de manière fortuite dans une boîte de Petri en 1928 par Alexander Fleming, la pénicilline a ouvert une nouvelle ère pour la médecine. Elle fut prescrite pour traiter les infections microbiennes à partir des années 40 et employée largement pendant la seconde guerre mondiale.⁸⁶ Cette découverte a été suivie d'un intense effort de recherche pour découvrir d'autres composés naturels ou synthétiques permettant de lutter contre les pathogènes microbiens. C'est ainsi que toutes les classes d'agents antimicrobiens utilisés de nos jours ont été découvertes entre les années 1950 et 1970, faisant de cette période l'âge d'or de la chimiothérapie antimicrobienne.⁸⁷ Ces médicaments ont permis de sauver des millions de vies à travers le monde et de contribuer à l'augmentation de l'espérance de vie.⁸⁸

L'euphorie de la « victoire » fut cependant de courte durée puisque très rapidement, les premières souches résistantes sont apparues et les phénomènes de résistances se sont répandus chez diverses espèces.⁸⁷ Aujourd'hui certaines souches présentent des résistances à la totalité des antibiotiques disponibles.⁸⁹ Actuellement, cette crise est d'autant plus grave que les changements sociétaux, comportementaux et environnementaux contribuent grandement à la transmission et à l'augmentation de la virulence des agents pathogènes.⁹⁰ Dans son premier plan d'action datant de 2011 visant à contrer la résistance aux antimicrobiens (RAM), la Commission Européenne soulignait quelques 25 000 décès annuels en Europe suite à des infections dues à des

⁸⁴ OMS. Résistance aux antimicrobiens. http://www.who.int/drugresistance/Microbes_and_Antimicrobials/fr/ (Accessed July 2017).

⁸⁵ Da Silva LCN, Da Silva MV, et al. Editorial: New Frontiers in the Search of Antimicrobials Agents from Natural Products. *Front Microbiol.* 2017; 8:210.

⁸⁶ Wright GD. Something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Can J Microbiol.* 2014; 60:147–154.

⁸⁷ Aminov RI. A brief history of antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front in Microbiol.* 2010; 1:1–7.

⁸⁸ Centers for Disease Control and Prevention, Office of Infectious Disease. Antibiotic resistance threats in the United States. April 2013. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013> (Accessed July, 2017).

⁸⁹ Fair JR, Tor Y. Antibiotics and Bacterial resistance in the 21st Century. *Perspec Med Chem.* 2014; 6:25-64.

⁹⁰ Cohen M. Changing patterns of infectious disease. *Nature.* 2000; 406:762–767.

bactéries résistantes aux antimicrobiens.⁹¹ Un second rapport de 2013 publié par le « Center for Disease Control » des États-Unis estimait qu'au moins 23 000 Américains mourraient d'infections dues à des pathogènes résistants aux antibiotiques.⁹²

Aujourd'hui, il semble que l'humanité soit face à une véritable menace sanitaire globale. Selon les estimations, le coût de l'inaction pourrait s'établir à 10 millions de décès par an à l'échelle mondiale et représenter une perte cumulée de plus de 88 000 milliards d'euros pour l'économie mondiale d'ici à 2050.⁹¹ Il est aujourd'hui crucial de découvrir de nouvelles sources d'antimicrobiens, afin d'obtenir des composés avec des structures et/ou des mécanismes innovants pour palier à cette crise mondiale.

2.1 Classe et mode d'action des antibactériens

Les agents antibactériens peuvent être classés sur la base de leur action en tant que bactéricide ou bactériostatique selon qu'ils détruisent la cellule bactérienne ou inhibent sa croissance. Toutefois il est parfois difficile d'émettre une limite claire entre ces deux catégories, les agents bactériostatiques induisant souvent une mortalité à plus forte dose.⁸⁷

Les bactéries sont réparties en deux grands groupes appelés Gram positif ou Gram négatif selon leurs caractéristiques membranaires (**Figure 13**). Ainsi les antibactériens ont souvent des activités différentes selon le groupe ciblé et peuvent être spécifiques de l'un ou l'autre des groupes.

⁹¹ Commission européenne. Communiqué de presse. Santé humaine et animale: La Commission poursuit la lutte contre la résistance aux antimicrobiens avec l'annonce d'un deuxième plan d'action. http://europa.eu/rapid/press-release_IP-17-205_fr.htm?locale=FR (Accessed October 2017).

⁹² Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. US Department of Health and Human Services. <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html> (Accessed October 2017).

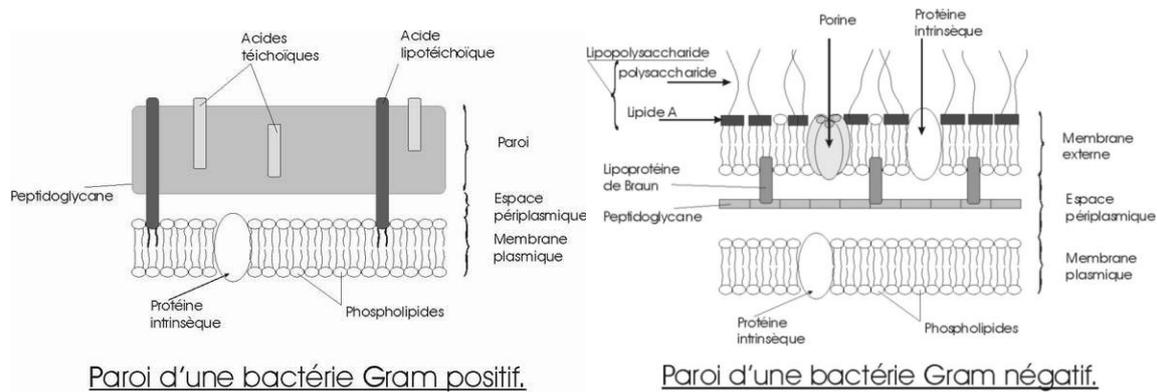


Figure 13: Structure de la paroi de bactéries à Gram positif (gauche) et à Gram négatif (droite)

©R. Moreda

La **coloration de Gram** doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui a mis au point le protocole en 1884. La technique de coloration repose sur les caractéristiques membranaires de la paroi de la bactérie.

La couche de peptidoglycane des **bactéries à Gram positif** est très épaisse et apparaît en violet après test. Elle est principalement formée de plusieurs couches de polymère de N-acétyl-glucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM) en série alternée. Le peptidoglycane des bactéries à Gram positif est traversé latéralement par de grandes chaînes polymériques qui le relie à la membrane plasmique : les acides lipotéichoïques. D'autres chaînes, telles les acides téichoïques, sont contenus dans le peptidoglycane et assurent sa stabilité.

Les **bactéries à Gram négatif** apparaissent colorées en rose après test. Leur paroi est plus complexe. Elles possèdent une double membrane organisée en trois grandes parties : la membrane externe composée de polysaccharides et de phospholipides, l'espace périplasmique comportant la paroi et la membrane plasmique. La couche de peptidoglycane (appelé aussi muréine) est relativement mince.

2.1.1 Antibactériens ciblant la paroi cellulaire

La paroi cellulaire des bactéries diffère de celle des autres organismes par la présence d'un squelette polysaccharide, appelé peptidoglycane composé d'un enchainement répété d'acide N-acétylmuramique et de N-acétylglucosamine.⁹³ Cette paroi joue naturellement un rôle clé dans la croissance bactérienne et représente donc une cible de choix. Parmi les antibactériens ayant pour cible la synthèse de la paroi cellulaire, on retrouve les β -lactamines et les glycopeptides.

2.1.1.1 Les β -lactamines

Les β -lactamines sont un vaste groupe d'antibactériens comprenant les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs

⁹³ Ullah H, Ali S. Classification of anti-bacterial agents and their functions. In: Antibacterial agents. Ed. Dr. Ranjith Kumavath. 2017:1–16.

de β -lactamase.⁸⁹ Cette catégorie regroupe tous les composés contenant un noyau β -lactame à 4 chaînons, responsable de l'activité. Les modifications au niveau de la chaîne latérale ou du noyau additionnel permettent d'obtenir les dérivés et de modifier les propriétés chimiques et biologiques de ces molécules (Figure 14).⁸⁹

Le premier antibiotique à noyau β -lactame découvert fut la pénicilline G, produite par le champignon filamenteux *Penicillium notatum*, et découvert en 1928 par Alexander Fleming.⁹⁴

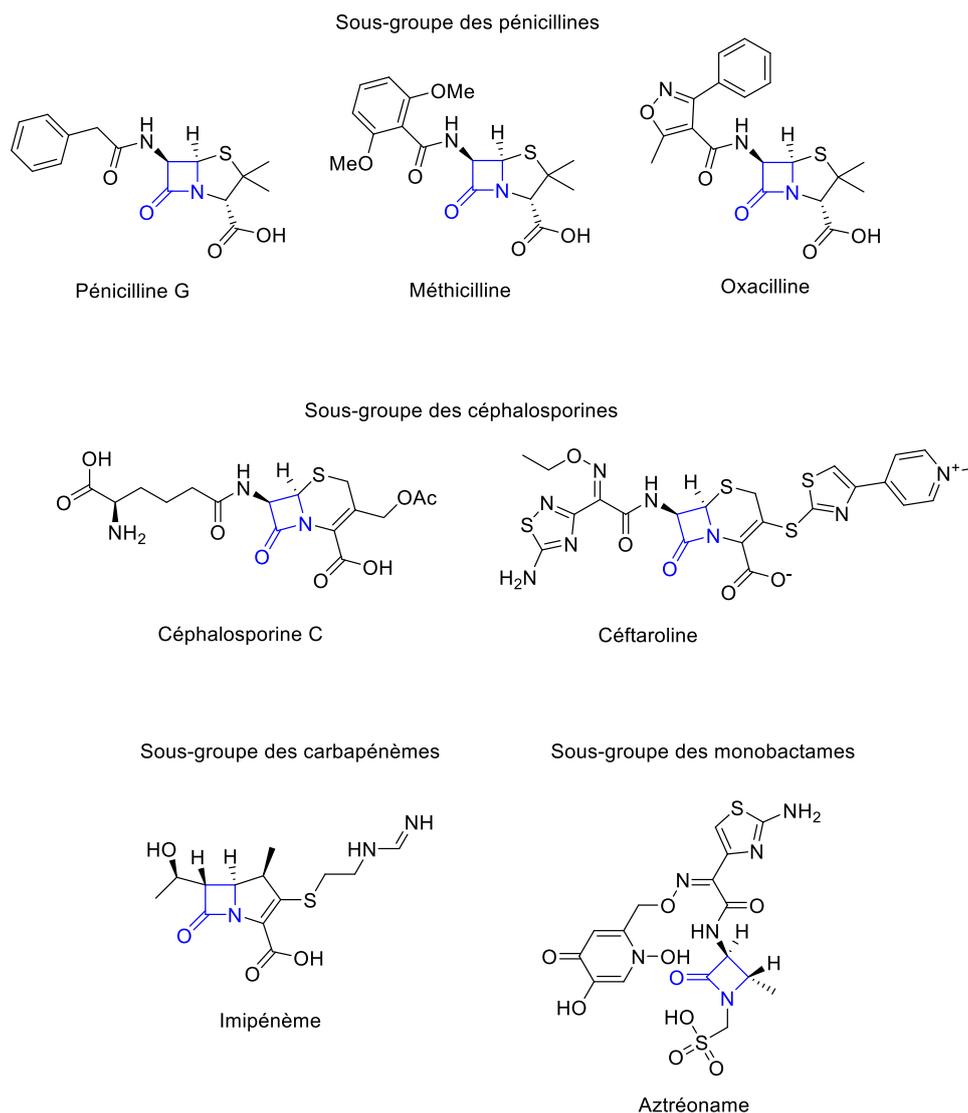


Figure 14: Antibactériens de la famille des β -lactamines (noyau β -lactame en bleu)

⁹⁴ Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Disc.* 2013; 12:371–387.

2.1.1.2 Les glycopeptides

Les glycopeptides sont des macrocycles peptidiques portant des fragments aromatiques glycosylés.⁸⁹ Le premier glycopeptide découvert fut la vancomycine, en 1952 (Figure 15).⁸⁹

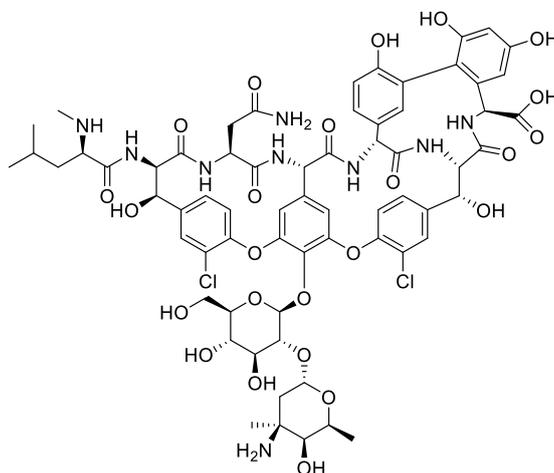


Figure 15: Vancomycine

2.1.2 Antibactériens inhibant la synthèse protéique

Sont regroupés dans cette catégorie les antibactériens de la famille des aminoglycosides, tétracyclines, chloramphénicole, macrolides, oxazolidinones et streptogramines. Seules quelques familles sont présentées ici.

2.1.2.1 Les aminoglycosides

Les aminoglycosides sont composés de deux à cinq unités de sucre substituées par des fonctions amine. La plupart d'entre eux sont construits autour d'un noyau central commun, constitué de 2-désoxystreptamine (2-DOS) (Figure 16).⁹⁴

Il a été démontré dans la littérature que le nombre et l'emplacement des groupements amino sur les sucres, ainsi que le site d'attachement au 2-DOS influent considérablement sur l'activité biologique.⁹⁵

⁹⁵ Benveniste R, Davies J. Structure-activity relationships among the aminoglycoside antibiotics: role of hydroxyl and amino groups. *Antimic Agents Chemother.* 1973; 4:402-409.

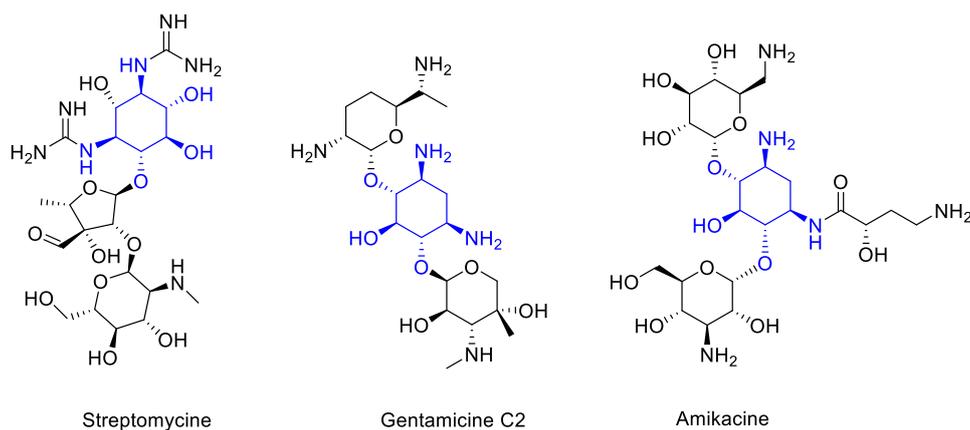


Figure 16: Antibactériens de la famille des Aminoglycosides (noyau 2-DOS en bleu)

Les aminoglycosides ont pour cible la sous-unité 30S des ribosomes et le site A (site de décodage) de l'ARN ribosomique 16S, induisant une mauvaise traduction des protéines. L'accumulation de protéines aberrantes conduit à terme à la létalité.⁹⁶

Le premier aminoglycoside découvert fut la streptomycine. Elle a été isolée à partir de *Streptomyces griseus* en 1943 et utilisée cliniquement trois années plus tard.⁹⁴ Un grand nombre d'aminoglycosides sont des substances naturelles, produites par des bactéries de la famille des Actinomycètes. Cependant, un certain nombre de ceux dernièrement développés et utilisés en clinique sont produits par héli-synthèse. C'est le cas de l'amikacine (Figure 16).

2.1.2.2 Les tétracyclines

Elles présentent un squelette octahydrotétracène. Les premières molécules découvertes telles que la tétracycline ou l'oxytétracycline sont naturelles. En revanche les derniers dérivés de cette famille sont des composés semi-synthétiques tels que la doxycycline et la minocycline, présentant de meilleures propriétés pharmacocinétiques (Figure 17).⁸⁹

⁹⁶ Kohanski MA, Dwyer DJ, et al. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8:423–35.

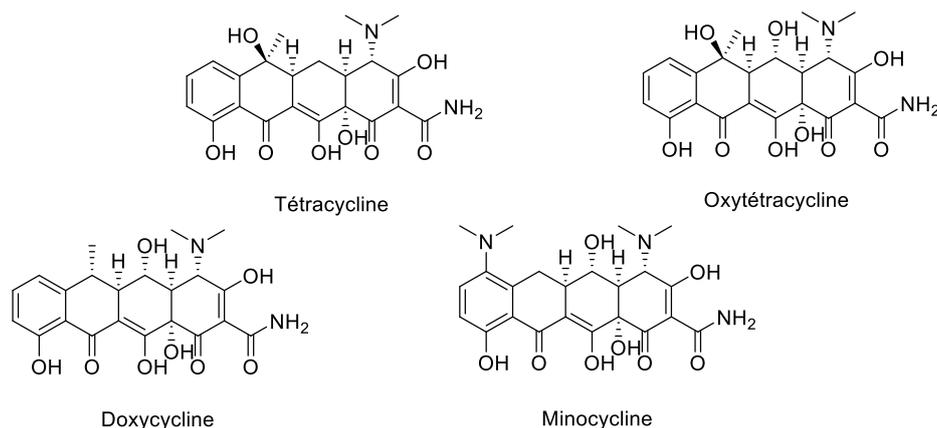


Figure 17: Antibactériens de la famille des Tétracyclines

Les tétracyclines se fixent à la sous-unité 30S du ribosome et bloquent la fixation de l'aminocyl-ARNt au site A du ribosome.⁹⁷

2.1.3 Antibactériens ciblant l'ADN et l'ARN

Cette catégorie regroupe les ansamycines et les quinolones. Les premières inhibent la synthèse de l'ARN bactérien alors que les secondes agissent au niveau des topoisomérases II (ADN gyrase) impliquées dans les mécanismes d'enroulement et de déroulement de l'ADN au cours de la réplication, facilitant l'action de l'ADN polymérase. La première quinolone découverte fut l'acide nalidixique en 1962 (Figure 18).⁸⁹ L'ajout de l'atome de fluor dans les années 70 a permis d'améliorer la pénétration intracellulaire de ces molécules, ce fut la naissance des fluoroquinolones. Depuis, des modifications successives sur les différentes positions ont engendré les différentes générations de fluoroquinolones, plus actives, et présentant des spectres d'activité plus larges.

⁹⁷ Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001; 65: 232–260.

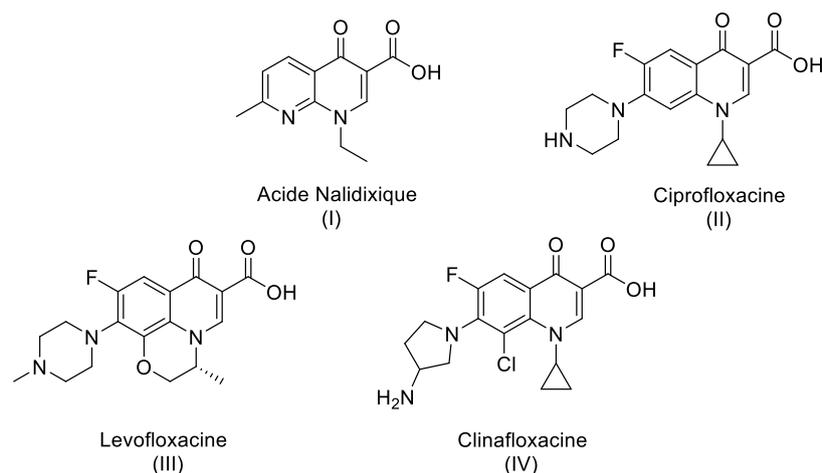


Figure 18: Quinolones de différentes générations

2.1.4 Autres antibactériens

Les lipopeptides sont des depsipeptides cycliques avec une chaîne peptidique latérale se terminant par une chaîne alkyle.⁸⁹ La daptomycine fut le premier lipopeptide découvert en 1985 et utilisé en clinique seulement depuis 2003 (Figure 19).⁹⁴ C'est encore aujourd'hui le seul représentant de cette classe utilisé cliniquement.

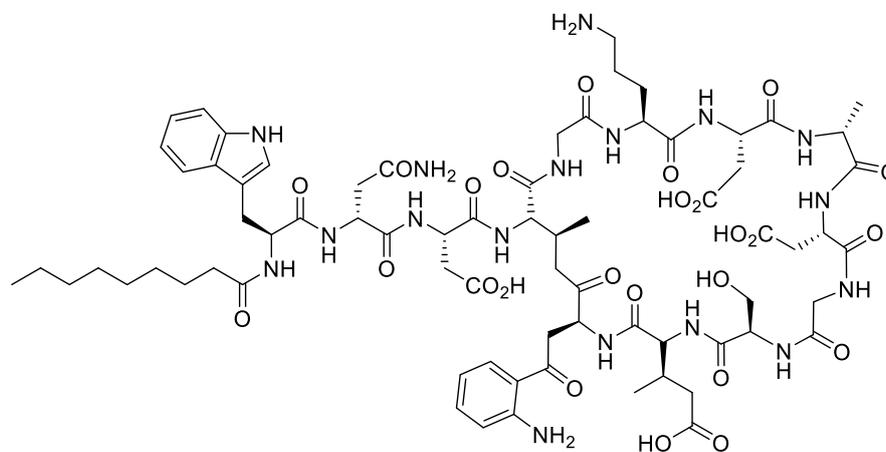


Figure 19: Daptomycine

Les lipopeptides s'insèrent dans la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif par l'intermédiaire de la « queue » alkyle, entraînant une dépoléarisation de la membrane par libération du potassium. L'intégrité structurale de la membrane étant perturbée, la bactérie meurt par lyse cellulaire.

2.2 Classe et mode d'action des antifongiques

Il existe actuellement 4 grandes classes d'antifongiques : les fluoropyrimidines, les polyènes, les azolés et les échinocandines, ciblant 3 voies métaboliques distinctes.

2.2.1 Les fluoropyrimidines

Les seules fluoropyrimidines actuellement utilisées chez l'homme sont la 5-fluorocytosine (5-FC) et sa forme active, le 5-fluorouracile (5-FU). Ce sont des molécules de synthèse, analogues structuraux de la cytosine (**Figure 20**).⁹⁸

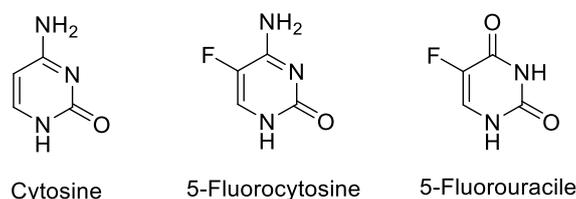


Figure 20: Structure chimique de la cytosine et de deux analogues fluorés, la 5-fluorocytosine et la 5-fluorouracile

La 5-FC n'a pas d'activité, ce sont les métabolites toxiques issus de sa conversion en 5-FU qui sont responsables de l'activité antifongique.^{99,100,101}

Elle a été synthétisée pour la première fois en 1957 par Duschinsky et ses collaborateurs à des fins antitumorales.¹⁰² Ce n'est qu'en 1963 que l'équipe de Grunberg découvre son potentiel antifongique sur des modèles murins de candidose et de cryptococcose.¹⁰³ En 1968, elle est utilisée avec succès chez l'homme pour traiter une candidose systémique et une méningite à cryptocoque.¹⁰⁴

⁹⁸ Vandeputte P, Ferrari S, et al. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol.* 2011; :1–26.

⁹⁹ Polak A, Scholer HJ. Mode of action of 5-fluorocytosine. *Revue de l'Institut Pasteur de Lyon.* 1980; 13:233–244.

¹⁰⁰ Benson JM, Nahata MC. Clinical use of systemic antifungal agents. *Clin Pharm.* 1988; 7:424–438.

¹⁰¹ Vermes A, Guchelaar HJ, et al. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46:171-179.

¹⁰² Duschinsky R, Plevén E, et al. The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J Am Chem Soc.* 1957; 79:4559–4560.

¹⁰³ Grunberg E, Titsworth E, et al. Chemotherapeutic activity of 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother.* 1963; 3:566–568.

¹⁰⁴ Tassel D, Madoff MA. Treatment of *Candida* sepsis and *Cryptococcus* meningitis with 5-fluorocytosine. A new antifungal agent. *JAMA.* 1968; 206:830–832.

Les fluoropyrimidines possèdent un spectre d'activité étendu. Leur efficacité a été démontrée sur les genres *Candida* et *Cryptococcus*, mais également chez les champignons filamenteux du genre *Aspergillus*.

En raison de sa grande hydrosolubilité et de sa petite taille, la 5-FC possède des propriétés pharmacocinétiques intéressantes puisqu'elle diffuse très rapidement dans tout l'organisme.¹⁰⁵ Malgré tout, elle est de moins en moins utilisée en mycologie médicale, en raison de la survenue fréquente de résistance chez les champignons pathogènes.¹⁰⁵ Aujourd'hui, elle est fréquemment utilisée en association avec d'autres antifongiques azolés ou avec l'amphotéricine B.^{106,107}

2.2.2 Les antifongiques polyéniques

Les polyènes sont des macrolactones de 20 à 40 atomes de carbones auxquelles est rattaché un groupement D-mycosamine. Ils présentent également une chaîne carbonée avec des doubles liaisons conjuguées (d'où leur nom de « poly-ène »).⁹⁸

De nombreux antifongiques appartenant à la classe des polyènes ont été isolés chez des bactéries du genre *Streptomyces*. Cependant, seules trois molécules ont une toxicité suffisamment limitée pour permettre leur utilisation en clinique : l'amphotéricine B (AmB), la nystatine et la natamycine (**Figure 21**).

¹⁰⁵ Daneshmend TK, Warnock DW. Clinical pharmacokinetics of systemic antifungal drugs. *Clin Pharmacokinet.* 1983; 8:17–42.

¹⁰⁶ Dannaoui E. Résistance des *Candida* aux antifongiques : détection et mécanismes. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2013; 450:71–77.

¹⁰⁷ Vandeputte P. Thèse. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Interactions ente organismes. Université d'Angers, 2008.

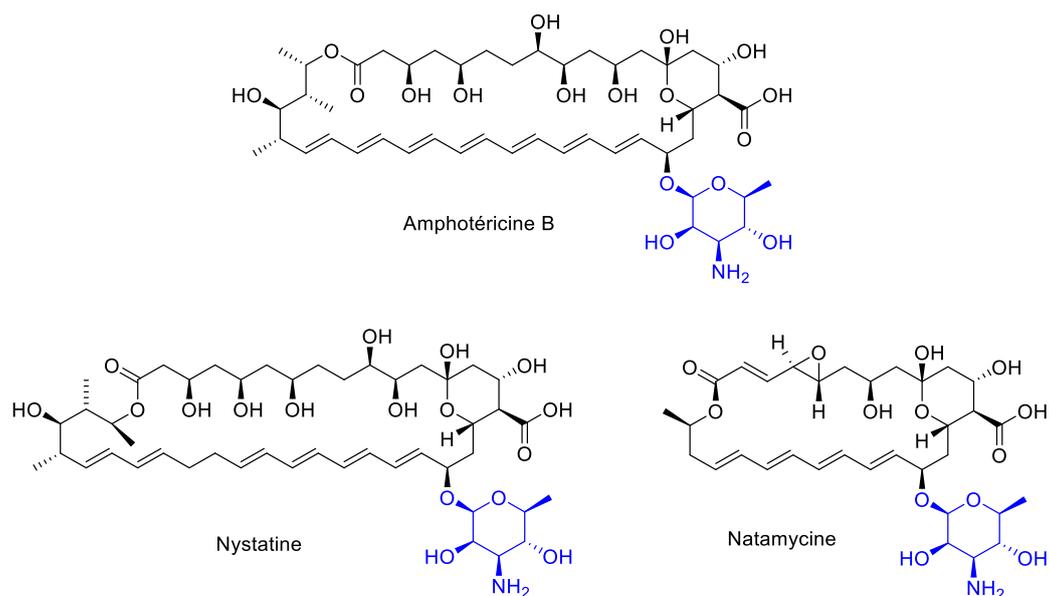


Figure 21: Structure des trois principaux polyènes antifongiques (noyau d-mycosamine en bleu)

La nystatine a été découverte en 1950, par Hazen et Brown, à partir d'une culture de *Streptomyces noursei*.¹⁰⁷ En 1959, l'AmB est isolée par Dutcher et ses collaborateurs à partir d'une culture de *Streptomyces nodosus*, prélevée dans un échantillon du fleuve Orénoque au Venezuela.¹⁰⁸ Enfin la natamycine est, quant à elle, produite par la bactérie *Streptomyces natalensis*.¹⁰⁷

Ces composés agissent en se fixant sur l'ergostérol, principal composant de la membrane plasmique des champignons. En s'associant à la bicouche lipidique de la membrane fongique, ils forment des pores, déstabilisant la membrane et provoquent ainsi une fuite des électrolytes cytoplasmiques à l'extérieur de la cellule.¹⁰⁷ L'AmB a également une activité de peroxydation des lipides membranaires et intracellulaires.¹⁰⁶

Les polyènes, bien que très affines à l'ergostérol, possèdent aussi une affinité non négligeable pour le cholestérol (l'équivalent chez l'homme de l'ergostérol fongique) ce qui leur confère une forte toxicité, à l'origine de multiples effets secondaires.¹⁰⁹ Toutefois, l'AmB est de loin l'antifongique polyénique de choix pour traiter les infections systémiques. Elle présente un spectre d'activité étendu, avec une activité sur la plupart des levures et champignons filamenteux. Elle est également un antiparasitaire de premier ordre et, par conséquent, est utilisée pour traiter les leishmanioses et certaines amibiases.¹⁰⁹

¹⁰⁸ Dutcher JD, Gold W, et al. Amphotericin B, its production and its salts. US patent 2 908 611. 1959.

¹⁰⁹ Lemke A, Kiderlen AF, et al. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005; 68:151–162.

2.2.3 Les antifongiques azolés

Les dérivés azolés sont des molécules cycliques organiques, qui peuvent être divisés en deux groupes, les imidazoles et les triazoles (**Figure 22**).¹¹⁰

Les dérivés azolés sont de loin les antifongiques les plus utilisés en médecine clinique. Pour cette raison, ce sont les composés les plus étudiés par la communauté scientifique, aussi bien au niveau de leurs propriétés pharmacologiques, que de leur mode d'action et des mécanismes de chimiorésistances des champignons pathogènes.

Les antifongiques azolés ont pour cible la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Ils inhibent l'activité d'une enzyme importante de cette voie de synthèse, la 14- α -déméthylase.¹⁰⁶ Cela a pour conséquence la disparition de l'ergostérol qui intervient normalement dans la fluidité de la membrane plasmique et l'accumulation d'autres stéroïdes toxiques pour le champignon.¹⁰⁶

Les effets secondaires observés avec les antifongiques azolés sont le plus souvent la conséquence de leur affinité pour les cytochromes P450, présents également chez l'homme.^{111,112}

¹¹⁰ Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10:1–10.

¹¹¹ Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter.* 2006; 19:130–139.

¹¹² Sanglard D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 2002; 20:462–469.

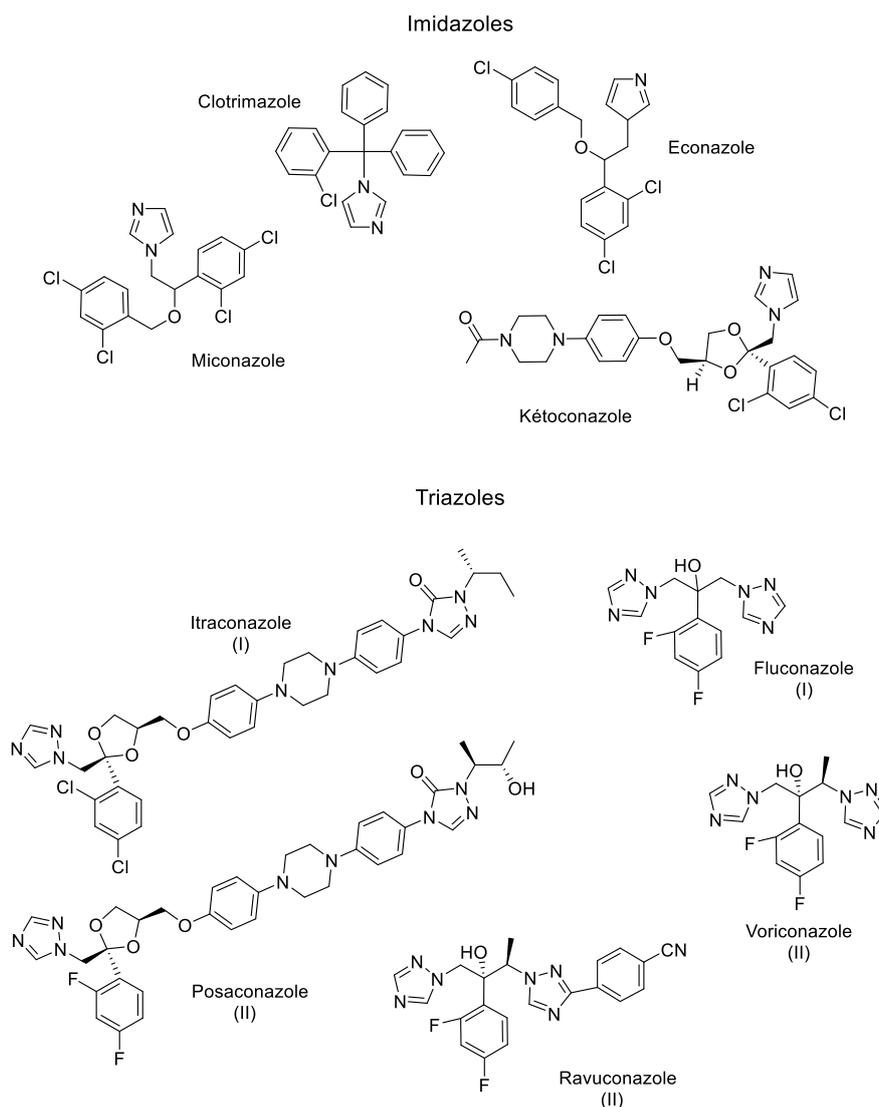


Figure 22: Structure des principaux antifongiques azolés (en haut imidazoles, en bas triazoles de première et seconde génération)

2.2.4 Les échinocandines

Depuis ces 15 dernières années, les échinocandines représentent la seule nouvelle classe d'antifongiques mise à disposition des praticiens pour lutter contre les infections fongiques invasives (**Figure 23**).¹¹³

Ce sont des dérivés synthétiques de lipopeptides sécrétés à l'état naturel par plusieurs espèces de champignons : *Aspergillus rugulovalvus* qui synthétise la caspofungine B, *Zalerion arboricola* la pneumocandine B, ou encore *Papularia sphaerosperma* la papulacandine.¹⁰⁷

¹¹³ Denning DW. Echinocandins: a new class of antifungal. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49:889–891.

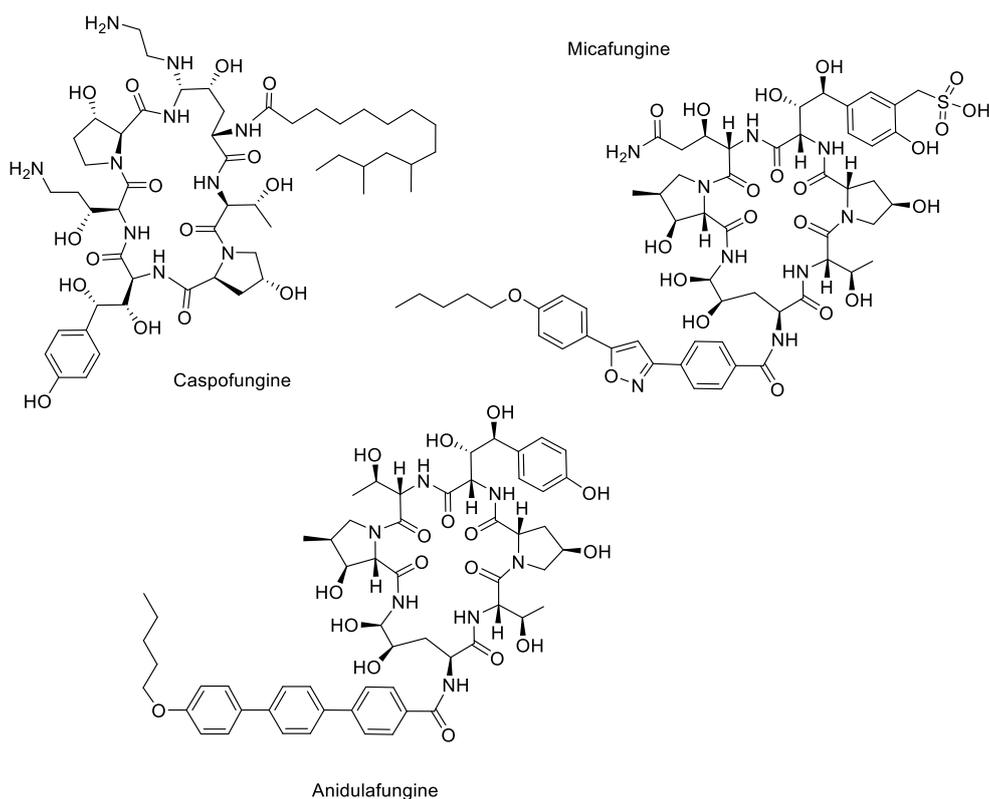


Figure 23: Structure de trois échinocandines utilisées en médecine clinique

Les échinocandines présentent des caractéristiques pharmacologiques intéressantes (faible toxicité, effets secondaires minimes et rares, élimination très lente) ce qui permet de n'effectuer qu'une administration par jour. De plus elles présentent de faibles interactions médicamenteuses à l'inverse des autres antifongiques.¹⁰⁷ L'association d'échinocandines avec d'autres antifongiques (AmB ou dérivés azolés) aboutit d'ailleurs le plus souvent à un effet synergique ou tout au moins additif.¹¹⁴

L'originalité des échinocandines réside dans leur cible chez le pathogène. Elles agissent au niveau de la paroi fongique, considérée comme une cible de choix car constituée de composants n'ayant pas d'équivalents chez l'homme et indispensable à la survie du micro-organisme.¹⁰⁶ Ce sont des inhibiteurs non compétitifs de la β -1-3-D-glucane synthase, enzyme permettant la synthèse du β -1-3-D-glucane, composant structural responsable du maintien de l'intégrité et de la rigidité de la paroi fongique.¹⁰⁶

Les échinocandines sont efficaces sur les genres *Candida* et *Aspergillus*, bien que ces molécules soient, pour une raison encore non totalement élucidée, fongicides sur le

¹¹⁴ Franzot SP, Casadevall A. Pneumocandin L-743,872 enhances the activities of amphotericin B and fluconazole against *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:331–336.

genre *Candida* et seulement fongistatiques sur les *Aspergillus*.^{115,116} Les espèces du genre *Trichophyton* ainsi que celles appartenant au genre *Fusarium*, sont insensibles aux échinocandines.

2.2.5 Autres antifongiques

D'autres antifongiques, tels que les morpholines et les allylamines, sont des agents topiques utilisés localement du fait de leur faible efficacité et de leurs importants effets secondaires lorsqu'ils sont administrés par voie générale (Figure 24).

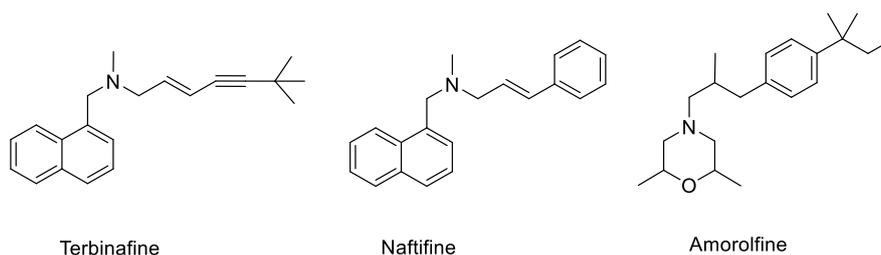


Figure 24: Antifongiques de la famille des allylamines et des morpholines.

¹¹⁵ Espinel-Ingroff A. Comparison of In vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:2950-2956.

¹¹⁶ Oakley KL, Moore CB, et al. In vitro activity of the echinocandin antifungal agent LY303, 366 in comparison with itraconazole and amphotericin B against *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42:2726-2730.

3 Les insecticides

Dès les premières civilisations, l'Homme a développé diverses stratégies pour préserver sa santé ainsi que ses cultures contre les nuisibles. Certaines méthodes de lutte contre les insectes sont très anciennes.¹¹⁷ Elles reposaient presque uniquement sur l'utilisation de produits naturels ou de préparations qui en découlent.

La première utilisation connue « intentionnelle » d'un pesticide remonte à 2500 av. J.-C., lorsque les Sumériens frottaient leur peau avec des composés soufrés à l'odeur désagréable, pensant pouvoir repousser les insectes.¹¹⁸ Des expérimentations avec les pesticides furent également répertoriées en Egypte ancienne avec le plus vieux document médical datant d'environ 1550 av. J.-C., connu sous le nom de papyrus Ebers.¹¹⁸ Il contient environ 800 recettes de diverses substances agissant comme des poisons ou des pesticides (**Figure 25**).¹¹⁸ Plus tard, les Chinois, les Grecs et les Romains utilisèrent des plantes et extraits de plantes avec du soufre et de l'arsenic pour lutter contre les insectes et rongeurs.¹¹⁹



Figure 25: Photo du papyrus Ebers

Au Moyen-Age, les ravageurs étaient principalement contrôlés par l'utilisation de décoctions faites à partir de feuilles de tabac, d'extraits, ou de fleurs de pyrèthres séchées (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) ainsi que de roténone, obtenues à partir de racines de plantes tropicales appartenant au genre *Lonchocarpus* ou *Derris* (**Figure 26**).

¹¹⁷ Nwabor FO. Larvicidal activity and toxicity of medicinal plant extracts on *Anopheles gambiense*. University of Nigeria, Nsukka. Department of Microbiology. 2012. http://www.academia.edu/4152651/Historical_development_of_insecticides (Accessed August 2017).

¹¹⁸ Taylor EL, Holley AG, et al. Pesticide development a brief look at the history. *South Reg Ext Forest*. 2007.

¹¹⁹ Regnault-Roger C, Philogène B, et al. Biopesticides d'origine végétale. Ed. Tec & Doc. 2002. 337p.



Figure 26: *Chrysanthemum cinerariaefolium* (©Manfred Ruckszio), *Derris elliptica* (©Forest and Kim Starr) et *Lonchocarpus nicou* (de gauche à droite)

Durant le 19^{ème} siècle et le début du 20^{ème} siècle, les produits de lutte utilisés étaient en grande partie des produits chimiques inorganiques à base de plomb et d'arsenic.¹¹⁸ Le développement des insecticides s'est accompagné du développement des équipements promouvant leur utilisation. C'est ainsi qu'en 1921, un avion est utilisé pour la première fois par des fermiers de l'Ohio pour asperger des champs avec de l'arséniate de plomb.¹¹⁸ Mais, la révolution en matière de pesticides arriva avec le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT). Synthétisé en 1874 par le Strasbourgeois Zeidler, ses propriétés insecticides ne sont découvertes qu'en 1939 par Paul Müller, qui reçut le Prix Nobel de médecine en 1948 pour cette découverte.¹¹⁸ Le DDT fut proposé à l'armée américaine durant la 2^{ème} guerre mondiale pour traiter les poux porteurs du typhus et les moustiques vecteurs du paludisme.¹¹⁹ Surfant sur la vague des nouvelles technologies et découvertes initiées par la guerre, de nouveaux groupes d'insecticides de synthèse furent développés.¹²⁰ Ainsi les Allemands développèrent les premiers insecticides organophosphorés, suivis par l'introduction progressive des carbamates dont les premiers furent développés dès 1931, dans les laboratoires Ciba-Geigy.¹¹⁹ La seconde guerre mondiale fut ainsi la « belle époque » des insecticides de synthèse, organochlorés, organophosphorés et autres carbamates.

3.1 Classe et mode d'action des insecticides chimiques

Il existe de très nombreux composés insecticides. Ces derniers sont communément classés en fonction de leur mode d'action. Ainsi, les principales fonctions physiologiques ciblées sont les nerfs et muscles, la croissance et le développement, la respiration, ou

¹²⁰ Banaszkiwicz T. Evolution of Pesticide Use. In: Contemporary Problems of Management and Environmental Protection. Ed. Prof. Dr hab. Krystyna A. Skibniewska. 2010. Vol 5, Chap 1: 7–18.

encore l'intestin, et cela par 29 mécanismes d'action différents.¹²¹ Seules quelques grandes classes seront présentées dans cette partie.

3.1.1 Les insecticides organochlorés

Ils furent parmi les insecticides chimiques les plus utilisés. Cette famille comprend le DDT, le chlordane, la dieldrine, l'aldrine et bien d'autres (**Figure 27**).¹²² Ces composés chlorés présentent la particularité d'être très peu solubles dans l'eau mais très solubles dans les lipides. Ils sont tous très peu ou pas biodégradables et donc persistants dans l'environnement.¹²²

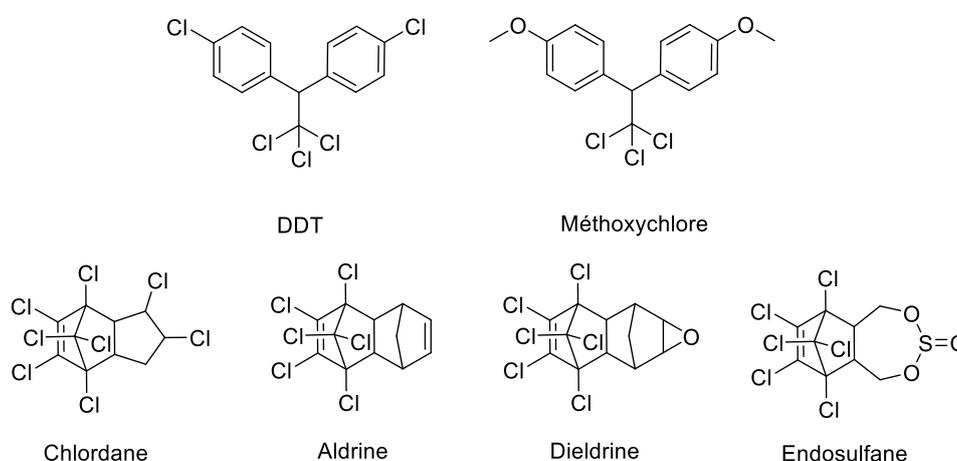


Figure 27: Insecticides de la famille des organochlorés

Les organochlorés peuvent être divisés en deux groupes :

- Les insecticides de type DDT, qui agiraient au niveau du système nerveux en désactivant les canaux sodiques, au même titre que les pyréthrinoïdes.¹²³ Les relations structure-activité de cette classe de composés ont montré l'importance de la substitution en *para* des groupements phényles, car une substitution différente conduit à une réduction de l'activité. La substitution en *para* permet aussi de prévenir la détoxification par hydrolyse enzymatique. Les groupements portés par les noyaux

¹²¹ IRAC. Insecticide Resistance Action Committee. Modes of action. <http://www.irac-online.org/modes-of-action/> (Accessed August 2017).

¹²² Coats JR. Mechanisms of toxic action and structure activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Env Health Pers.* 1990; 87:255–262.

¹²³ Holan G. New halocyclopropane insecticides and the mode of action of DDT. *Nature.* 1969; 221:1025–1029.

phényles doivent être apolaires et d'un volume moléculaire relativement petit pour permettre d'atteindre le système nerveux, site d'action de ces composés.^{123,124,125}

- La seconde catégorie regroupe plusieurs structures différentes, souvent bicycliques et polychlorées comme le chlordane. Ce sont des antagonistes des récepteurs de l'acide γ -aminobutyrique (GABA).¹²⁶ Ces récepteurs jouent un rôle critique dans la régulation de l'activité neuronale permettant notamment le passage des ions chlorures. Ainsi les organochlorés vont induire une hyperpolarisation membranaire se traduisant par une hyperexcitation chez l'insecte aboutissant à la mort.

3.1.2 Les insecticides organophosphorés

Le développement des organophosphorés (OP) est apparu comme une alternative aux composés organochlorés persistants dans l'environnement et l'organisme humain.

Bien qu'ils présentent l'avantage d'être rapidement dégradables dans l'environnement, ils ont des effets toxiques sur le système nerveux des vertébrés.¹²⁷ Leur développement a été initié durant la seconde guerre mondiale par Gerald Schrader en Allemagne, au cours de recherches sur les gaz neurotoxiques.¹²⁰ Le premier OP commercialisé fut le tétraéthyl pyrophosphate (TEPP). En 1944, le parathion est synthétisé, puis le malathion quelques années après.¹¹⁷ Du fait de sa toxicité le malathion est interdit d'usage dans l'Union Européenne depuis décembre 2008 (Figure 28).¹²⁸

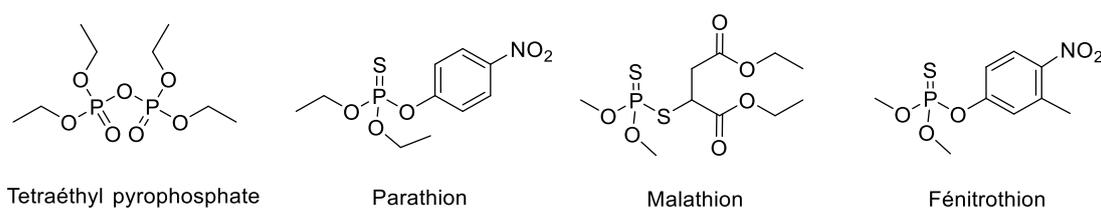


Figure 28: Insecticides de la famille des organophosphorés

¹²⁴ Narahashi T. Nerve membrane as a target for pyrethroids. *Pestic Sci.* 1976; 7:267–272.

¹²⁵ Coats JR. Structure-activity relationships in DDT analogs. In: *Insecticide Mode of Action* (J. R. Coats, Ed.), Academic Press, New York, 1982; 29–43.

¹²⁶ Bloomquist JR, Soderlund DM. Neurotoxic insecticides inhibit GABA-dependent chloride uptake by mouse brain vesicles. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985; 133: 37–43.

¹²⁷ Sanchez-Bayo F. Insecticides Mode of Action in Relation to Their Toxicity to Non-Target Organisms. *J Environm Analytic Toxicol.* 2011; S:4

¹²⁸ Journal Officiel de la République Française (JORF). No. 204 du 4 septembre 2007 page 14592 texte n° 143. <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000823784&fastPos=1&fastReqId=353325766&categorieLien=id&oldAction=rechTexte>

La toxicité des organophosphorés est due à leur capacité à inhiber l'acétylcholine estérase (AChE), enzyme impliquée dans l'hydrolyse des neurotransmetteurs acétylcholine (ACh).¹²⁹ Ils agissent en phosphorylant le résidu sérine du site actif de l'enzyme, inhibant ainsi son activité.

3.1.3 Les carbamates

Les carbamates peuvent être insecticides, herbicides ou fongicides selon leur structure. Les carbamates insecticides sont des inhibiteurs de l'AChE, tout comme les organophosphorés. Le premier carbamate insecticide découvert fut le carbaryle par les laboratoires Geigy en 1957 (Figure 29).¹¹⁹

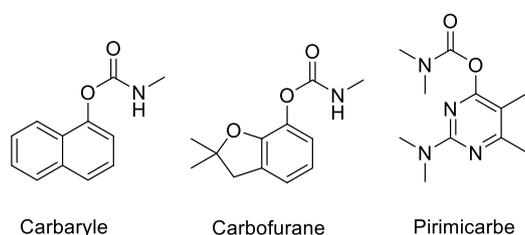


Figure 29: Insecticides de la famille des carbamates

3.1.4 Les pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes sont également des insecticides neurotoxiques. La pyréthrine est le premier représentant de cette famille commercialisée en 1928. Elle fut extraite d'une variété de chrysanthème (*Chrysanthemum cinerariaefolium*).¹³⁰ En 1949, l'alléthrine est introduite sur le marché. Bien qu'actives, ces molécules présentent l'inconvénient d'être instables à la lumière. Ainsi de nombreux analogues photostables ont été synthétisés, c'est le cas de la perméthrine, la dèltaméthrine et la cyperméthrine qui sont des dérivés halogénés. Ces derniers sont aussi plus lipophiles et par conséquent, traversent mieux la cuticule des insectes et les membranes biologiques.¹³⁰

Les pyréthrinoïdes sont des esters de l'acide chrysanthémique. Ils sont classés en deux catégories selon qu'un groupe nitrile est présent ou non (Figure 30).¹³⁰ Ils agissent au niveau des canaux sodiques, en les inactivant. Cela entraîne une dépolarisation

¹²⁹ Fukuto TR. Mechanisms of action of organophosphate and carbamate insecticides. *Env Health Persp.* 1990; 87:245–254.

¹³⁰ Kadala PA. Thèse. Action des pyréthrinoïdes sur le canal sodique activé par le potentiel des neurones du système olfactif de l'abeille domestique *Apis mellifera*. L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. 2011.

membranaire avec blocage de la conduction nerveuse. Il en résulte une paralysie chez l'insecte, appelée effet knock-down (KD) qui entraîne la mort de ce dernier.¹³¹

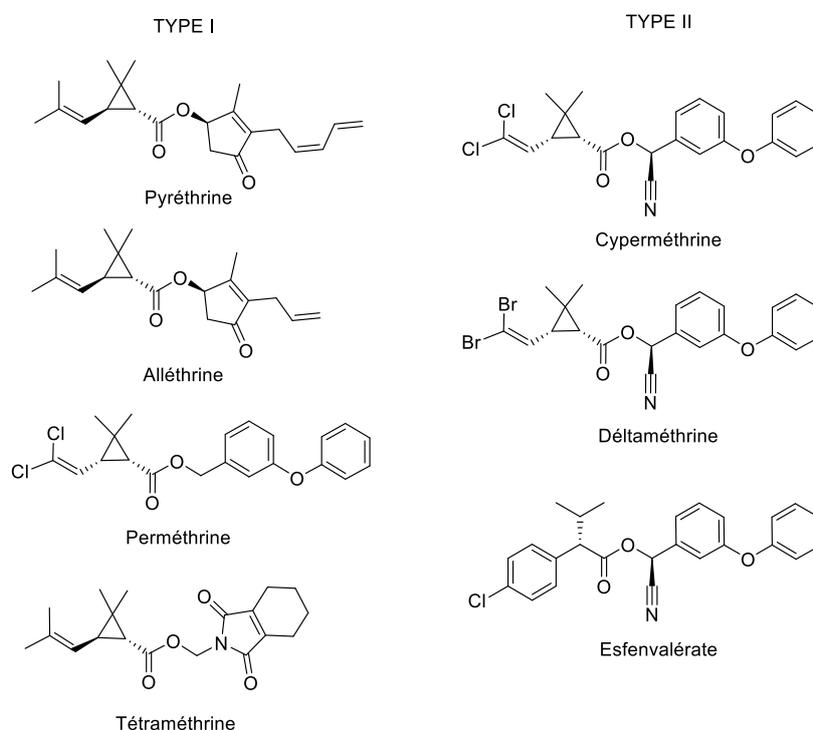


Figure 30: Insecticides de la famille des pyréthrinoides

Certaines molécules, comme l'alléthrine, la perméthrine et la tétraméthrine sont désormais interdites d'utilisation en Europe à des fins agricoles. Cependant ces molécules sont utilisées dans d'autres contextes. Par exemple, l'Organisation Mondiale de la Santé recommande d'utiliser des tentes ou des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides pour la protection contre les moustiques.^{132,133}

3.1.5 Les néonicotinoïdes

Ils figurent parmi les insecticides les plus populaires. En 2008, les néonicotinoïdes représentaient 24% du marché des insecticides dans le monde.¹³⁴ Ce sont des

¹³¹ Soderlund DM. Molecular Mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Arch Toxicol.* 2012; 86:165–181.

¹³² OMS. Guide pour le traitement et l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide. 2002. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67574/1/WHO_CDS_RBM_2002.41_fre.pdf (Accessed September 2017)

¹³³ OMS. Paludisme. Méthode de lutte antivectorielle de base. http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/core_methods/fr/ (Accessed August 2017).

¹³⁴ Jeschke JA, Blissard GW, et al. On the classification and nomenclature of baculovirus: A proposal for revision. *Arch Virol.* 2011; 151:1257–1266.

neurotoxines qui se fixent de manière irréversible au récepteur nicotinique de l'acétylcholine. La stimulation intense et continue au niveau des cellules nerveuses entraîne une paralysie chez l'insecte puis la mort.¹³⁵

Le premier membre de cette famille mis sur le marché fut l'imidaclopride, enregistré sous la dénomination « Hachikusan » au Japon en 1993. L'imidaclopride est l'insecticide le plus utilisé aujourd'hui dans le monde (Figure 31).^{134,136}

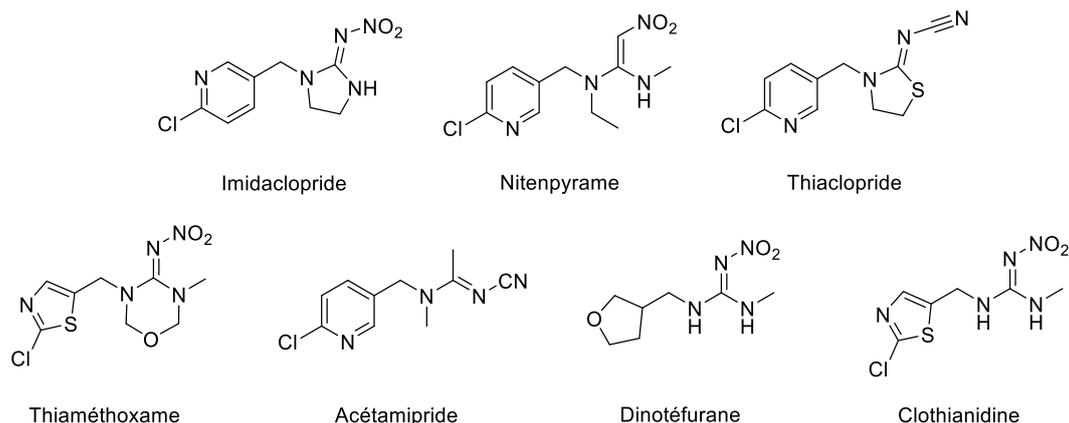


Figure 31: Insecticides de la famille des Néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes présentent une large gamme d'activité, agissant par ingestion et par contact. De plus ils auraient un impact moindre sur l'environnement et les espèces non ciblées en comparaison des autres familles.¹³⁷ Toutefois, de récentes études ont mis en cause les néonicotinoïdes dans la baisse importante des populations d'abeilles, sur lesquelles elles seraient toxiques même à très faible dose.^{138,139} Leur persistance dans les sols est aussi un problème. Ainsi, certaines de ces substances ont déjà vu leurs usages restreints au niveau européen depuis la fin 2013 en attendant de nouveaux rapport de l'EFSA (European Food safety Authority).¹⁴⁰

¹³⁵ Réseaux de Réflexion et de Recherches sur les Résistances aux pesticides. https://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKewiZ5qCBqZjWAhXB0RQKHYNfBhoQFggsMAE&url=http%3A%2F%2Fcolloque.inra.fr%2Fresistances-pesticides%2FMedia%2FFichier%2Fdiaporamas%2F11-MOA-insecticides-MSp&usq=AFQjCNFk4nhkxOujm_udNtCvGV1QFkOAiQ (Accessed August 2017).

¹³⁶ Yamamoto I. Nicotine to nicotinoids : 1962 to 1997. In: Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor. Ed. Yamamoto I, Casida JE. Springer-Verlag, Tokyo, Japan. 1999; 3–27.

¹³⁷ Oberemok VV, Laikova KV, et al. A short history of insecticides. *J Plant Prot Res.* 2015; 55.

¹³⁸ Goulson D. Neonicotinoids impact bumblebee colony fitness in the field; a reanalysis of the UK's Food & Environment Research Agency 2012 experiment. *Peer J.* 2015.

¹³⁹ Woodcock BA, Isaac NJB, et al. Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England. *Nature Comm.* 2016; 7:12459.

¹⁴⁰ Journal Officielle de l'Union Européenne. Règlement d'exécution (UE) No 485/2013 de la commission du 24 mai 2013. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:139:0012:0026:FR:PDF> (Accessed August 2017).

3.1.6 Autres insecticides

D'autres familles d'insecticides agissent sur la croissance et le développement des insectes. Parmi eux, on retrouve des analogues d'hormones de croissance (kinoprène, fénoxycarbe, etc.), des dérivés d'acide tétronique et tétramique, ou encore des benzoylurées (Figure 32).¹²¹ Ces derniers ont la particularité d'inhiber la biosynthèse de la chitine empêchant ainsi le développement des insectes, notamment lors des étapes importantes de passage du stade larvaire au stade adulte. Ils agissent en empêchant l'incorporation des résidus *N*-acétylglucosamine constitutifs de la chitine.¹⁴¹ De ce fait ces composés peuvent avoir des effets délétères sur les crustacés dont la carapace est également constituée de chitine.¹⁴¹

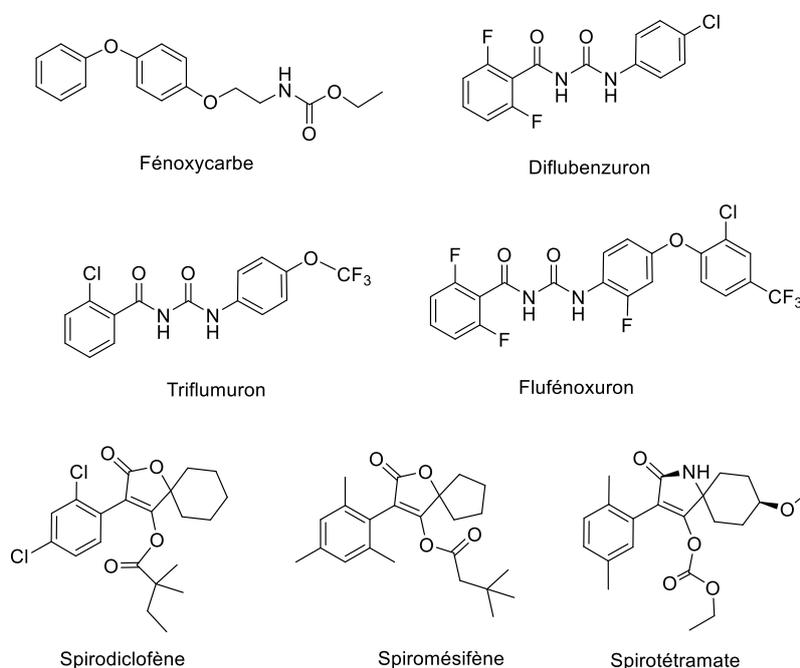


Figure 32: Insecticides ciblant la croissance et le développement des insectes

Cette classe d'insecticides a également été très utile dans de nombreux programmes de lutte intégrée, car leur mécanisme d'action est totalement différent des autres grandes familles d'insecticides (agissant principalement sur le système nerveux). Par conséquent, ils peuvent être utilisés en substitut d'autres agents ce qui permettrait d'éviter les phénomènes de résistance et de minimiser les risques liés à l'accumulation de résidus de pesticides dans l'environnement.¹⁴²

¹⁴¹ Post LC, Vincent WR. A new insecticide inhibits chitin synthesis. *Naturwissenschaften*.1973; 60:431–432.

¹⁴² Matsumura F. Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: A review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects. *Pest Biochem Physiol*. 2009; 97:133–139.

3.2 Les insecticides naturels

Il n'existe pas de définition officielle de biopesticide. Etymologiquement, un biopesticide se définit comme tout pesticide d'origine biologique, c'est-à-dire composé d'organismes vivants ou substances d'origines naturelles synthétisées par ces derniers.¹¹⁹ Les produits considérés comme des biopesticides par les agences de réglementation européennes et mondiales sont d'origines diverses. Ils peuvent être classés en trois grandes catégories, selon leur nature : les biopesticides végétaux, les biopesticides microbiens et les biopesticides animaux.¹⁴³ Seules les deux premières catégories seront traitées dans cette partie.

Les biopesticides se sont progressivement développés pour pallier aux nombreux désordres environnementaux et cas de résistances observés suite à l'usage abusif des pesticides de synthèse.¹⁴⁴

Avec les nouveaux programmes de lutte intégrée, l'objectif n'est plus d'éradiquer les nuisibles, mais plutôt de réguler leurs populations au-dessous des niveaux qui causent des dommages sanitaires et économiques. Cette approche combine différents moyens de lutte avec une surveillance minutieuse des insectes ciblés et de leurs ennemis naturels. L'idée est de combiner différentes pratiques afin de surmonter les faiblesses des pratiques uniques.

3.2.1 Les biopesticides d'origine végétale

Les végétaux et les insectes ont co-évolué de manière étroite. L'étude de leurs relations met en évidence la production de médiateurs chimiques exerçant une grande variété d'effets sur les insectes, dont la répulsion et/ou la toxicité.¹¹⁹

Une des démarches les plus utilisées pour identifier des végétaux potentiellement source de phyto-insecticide consiste en la réalisation d'enquêtes ethnobotaniques sur leurs utilisations traditionnelles. C'est ainsi que les activités insecticides d'*Azadirachta indica* (neem) et de la plante rwandaise *Tetradenia riparia* ont été remarquées.^{145,146}

¹⁴³ Chandler D, Bailey AS, et al. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Phil Trans R Soc B*. 2011; 366:1987–1998.

¹⁴⁴ ANSES. Dossier. Les résistances aux insecticides, antiparasitaires, antibiotiques... Comprendre ou en est la recherche ? <https://www.anses.fr/fr/system/files/CDLR-mg-Antibioresistance3.pdf> (Accessed September 2017).

¹⁴⁵ Schmutterer H. Properties and potential of natural pesticides from neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu Rev Entomol*. 1990; 35:271–297.

Plusieurs molécules ont été identifiées dans l'huile extraite des graines de neem dont l'azadirachtine, la nimbine, la nimbidine, la salannine, et le méliantriol (Figure 33).¹⁴⁷ L'azadirachtine, un mélange de sept isomères d'un tétranortriterpinoïde, est le principal ingrédient actif de cette huile et à la propriété de perturber la morphogénèse et le développement embryonnaire des insectes.¹⁴⁸

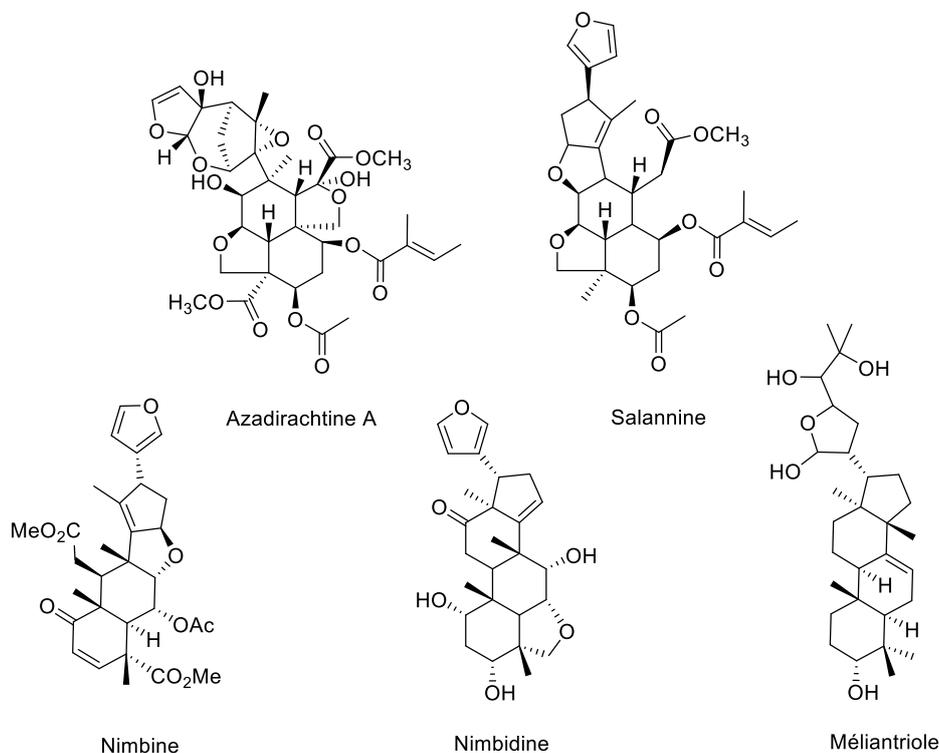


Figure 33: Molécules extraites de l'huile d'*Azadirachta indica*

Un biopesticide, nommé PONNEEM, a d'ailleurs été développé récemment à partir de l'huile de neem et de *Pongamia glabra*, actif contre deux genres de moustiques vecteurs *Anopheles* et *Culex*.¹⁴⁹ Les espèces du genre *Pongamia* sont retrouvées en Asie. *Pongamia pinnata* a été reconnue comme insecticide et nématicide.¹⁵⁰

Parmi les plantes actives sur les moustiques, on retrouve également l'extrait d'*Ocimum basilicum* (poudre de sabja), une herbe aromatique qui possède des propriétés larvicides

¹⁴⁶ Dunkel FV, Weaver DK, et al. Growth regulatory effects of Rwanda medicinal plant, *Tetradenia riparia* (Hochst) (Lamiaceae) on stored grain and bean insects. In: Fleurat-Lessard F & Ducom P. Proceedings 5th International Working Conference on Stored – Products Protection (vol. III). Bordeaux, France. 1990; 1609–1618.

¹⁴⁷ Neem: A Tree for Solving Global Problems. National Academy Press, Washington DC. 1992; 39–50

¹⁴⁸ Srivastava M, Raizada R. Lack of toxic effect of technical azadirachtin during postnatal development of rats. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45:465–471.

¹⁴⁹ Maheswaran R, Ignacimuthu S. A novel biopesticide PONNEEM to control human vector mosquitoes *Anopheles stephensi* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Environ Sci Pollut Res.* 2015; 22:13153–13166.

¹⁵⁰ Brijesh S, Daswani PG, et al. Studies on *Dalbergia sissoo* (Roxb.) leaves: possible mechanism(s) of action in infectious diarrhoea. *Indian J Pharmacol.* 2006; 38:120–124.

et répulsives sur *Aedes Aegypti*.¹⁵¹ De même, les espèces de *Vitex* contiennent de nombreux composés actifs. L'extrait à l'hexane des feuilles de *V. negundo* s'est révélé actif sur *Culex quinquefasciatus* avec une LC₅₀ de 18,6 ppm. L'activité serait due aux acides gras présent dans l'extrait.^{152,153} Un autre exemple décrit dans la littérature concerne un arbuste d'Amérique : *Quassia amara*, dont est extraite la quassine. Cette molécule présente des propriétés insecticides avec une faible toxicité pour l'Homme, les animaux domestiques et les insectes utiles.¹⁵⁴

Enfin les plantes à pesticides intégrés (Plant-Incorporated-Protectants, PIPs) sont des organismes modifiés par génie génétique, capables de produire et d'utiliser des substances pesticides afin de se protéger contre les insectes, les virus ou les champignons. Les PIPs les plus connues sont des plants de pommes de terre, maïs et coton ayant la particularité de produire la protéine Cry de *Bacillus thuringiensis*. Les premières PIPs ont été cultivées aux États-Unis en 1995-96. Certains pays de l'Union Européenne émettent des réticences quant à leur utilisation pour des raisons d'éthique, de morale et des réserves sur leur sûreté biologique. Seuls 5 des 28 pays membres ont adopté leur utilisation.¹⁵⁵

3.2.2 Les biopesticides microbiens

Les biopesticides microbiens représentent 30% des ventes de biopesticides.¹⁵⁶ Cette catégorie comprend les bactéries, champignons, virus et protozoaires naturels ou génétiquement modifiés.

Les micro-organismes entomopathogènes, ennemis naturels des insectes, sont une cause importante de mortalité dans les populations en milieu naturel.¹⁵⁷ La recherche s'est

¹⁵¹ Murugan K, Murugan P, et al. Larvicidal and repellent potential of *Albizia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta:Diptera:Culicidae). *Bioresour Technol.* 2006; 98:198–201.

¹⁵² Kamaraj C, Abdul Rahman A, et al. Larvicidal efficacy of medicinal plant extracts against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). *Trop Biomed.* 2010; 27:211–219.

¹⁵³ Kannathasan K, Senthilkumar A, et al. Larvicidal activity of fatty acid methyl esters of *Vitex* species against *Culex quinquefasciatus*. *Parasitol Res.* 2008; 103:999–1001.

¹⁵⁴ Deravel J, Krier F, et al. Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotech Agrol Soc Env.* 2014; 18:220–232.

¹⁵⁵ Kumar S, Chandra A, et al. *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. *J Env Biol.* 2008; 29:641–653.

¹⁵⁶ Thakore, Y. The biopesticide market for global agricultural use. *Ind Biotechnol.* 2006 ;2:194–208

¹⁵⁷ Usta C. Microorganisms in biological pest control - A review (Bacterial toxin application and effect of environmental factors). In: Current Progress in Biological Research. Ed. Dr.MarinaSilva-Opps. 2013.

concentrée sur la production relativement facile et peu coûteuse de certains genres dont des champignons du genre *Metarhizium*, *Beauveria* et *Verticillium* ou des bactéries du genre *Bacillus*.¹⁵⁸ Les préparations à base d'entomopathogènes sont fréquemment employées avec de faibles doses d'insecticides de synthèse. Ainsi la bovérine, un mycoinsecticide de *Beauveria bassiana*, est utilisée avec le trichlorofon (organosphosphate) pour lutter contre *Cydia Pomonella* et *Leptinotorse decemlineata* deux ravageurs de la pomme de terre. Anderson et son équipe ont d'ailleurs mis en évidence un effet synergique des deux agents insecticides.¹⁵⁹

Les biopesticides issus de *Bacillus thuringiensis* sont les plus commercialisés. Ils représentent plus de 70% des ventes.¹⁶¹ *Bacillus thuringiensis* est connu depuis le début des années 1900, mais le contrôle des espèces de diptères a été établi, seulement après la découverte de deux souches : *B. thuringiensis serovar israelensis* (Bti) en 1977 et *B. sphaericus* (Bs).¹⁶⁰ D'autres espèces bactériennes du genre *Bacillus* utilisent des mécanismes d'action différents et peuvent également être utilisées pour protéger les plantes. Ainsi *Bacillus amyloliquefaciens* et *B. subtilis* sont capables de coloniser les racines des plantes et de produire des molécules lipopeptidiques, les surfactines, iturines et fengycines (**Figure 34**). Ces dernières peuvent activer les défenses des plantes ou avoir un effet antibactérien ou antifongique direct.¹⁶¹

¹⁵⁸ AbdelGhany TM. Entomopathogenic Fungi and Their Role In Biological Control. Ed. Tarek Mohamed Abd El-Ghany. 2015.

¹⁵⁹ Ferron P. Modification of the development of *Beauveria tenella* mycosis in *Melolontha melolontha* larvae by means of reduced doses of organophosphorus insecticides. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1971; 14:457–466.

¹⁶⁰ Carlberg G. *Bacillus thuringiensis* and microbial control of flies. *MIRCEN J Applied Microbiol Biotech*. 1986; 2:267–274.

¹⁶¹ Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*. 2008; 16:115–125.

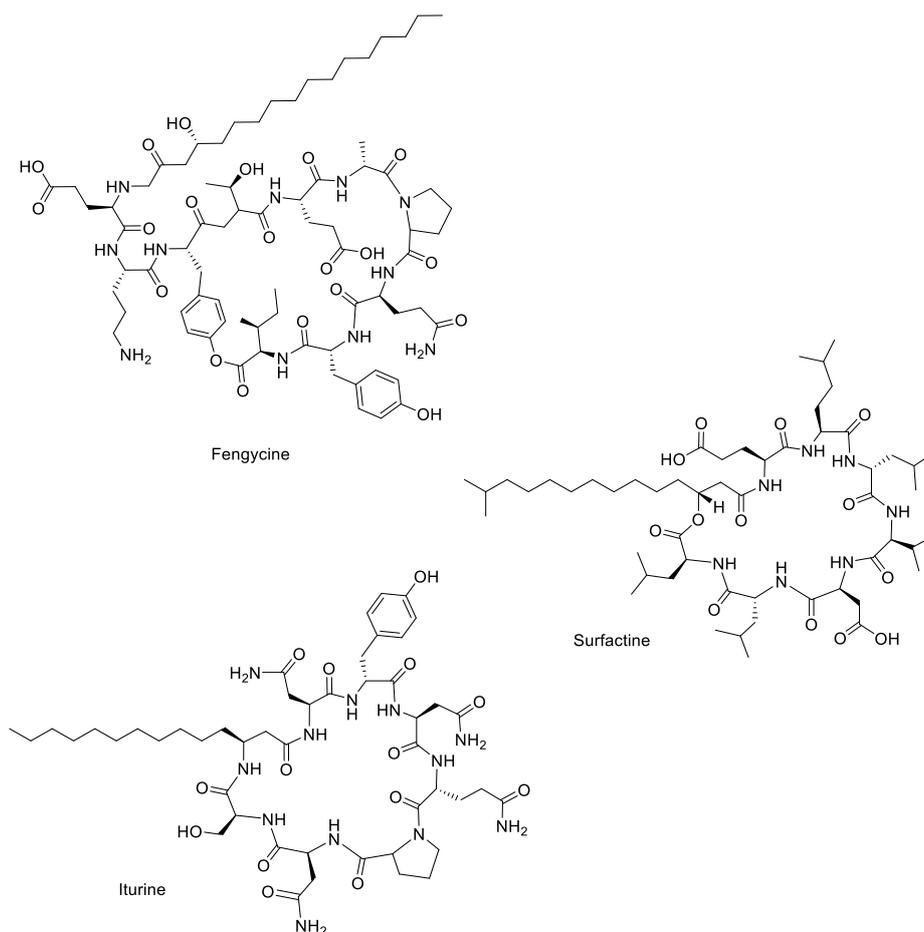


Figure 34: Molécules isolées de bactéries du genre *Bacillus*

Outre les bactéries, on retrouve des virus insecticides dont les baculovirus. Ces derniers sont présents sous deux formes virales génétiquement identiques mais structurellement différentes.¹⁵⁴ La forme dite « virion inclus » infecte les cellules intestinales et la forme dite « virion bourgeonnant » transmet l'infection de cellule en cellule.¹⁵⁴ L'infection primaire débute dans l'intestin moyen après ingestion et produit les formes bourgeonnantes qui progressent dans les tissus de l'hôte. La propagation dure environ 4 jours, se traduit par une liquéfaction des tissus puis la mort de l'insecte.¹⁶² Leur première utilisation remonte aux années 1940 avec l'utilisation de nucléopolyhédrovirus par l'Américain Edward Steinhaus pour lutter contre les chenilles de la luzerne.¹³⁷ Toutefois les baculovirus sont plus coûteux à développer que les autres agents chimiques. De plus, beaucoup sont hôtes spécifiques, par conséquent ils ne peuvent être utilisés sur différents nuisibles.

¹⁶² Washburn J, Trudeau D, et al. Early pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens*: a comparison of the 'M' and 'S' strategies for establishing fatal infection. *J Gen Virol.* 2003; 84:343–351.

4 Les phénomènes de résistances

Les phénomènes de résistance sont des processus biologiques naturels survenant dans le temps. Ils résultent de mutations génétiques permettant l'adaptation des organismes face à un stress et donc la survie de l'espèce.

4.1 La résistance aux antimicrobiens

Les résistances aux antimicrobiens peuvent être rencontrées chez des organismes n'ayant eu aucun contact avec les substances antimicrobiennes utilisées par l'Homme.¹⁶³ Pour exemple, des souches bactériennes trouvées dans des sédiments présents dans le pergélisol sibérien depuis des millions d'années présentaient une résistance à de multiples antimicrobiens tels que la tétracycline, la streptomycine ou encore le chloramphénicol,¹⁶³ tous couramment utilisés de nos jours en thérapie médicale. Il est important de noter que le chloramphénicol est un antibiotique moderne de synthèse. Les populations bactériennes naturelles peuvent donc véhiculer des gènes de résistance contre des antibiotiques qu'elles n'ont jamais rencontrés.

Nombreux sont les facteurs ayant contribué au développement des résistances aux antimicrobiens. Chez l'être humain on recense un usage abusif et/ou inadapté des médicaments, avec notamment des prescriptions trop importantes, non justifiées, avec un non-respect de la posologie et des délais de traitements.⁹⁴ Chez l'animal l'usage important d'antibiotique pour traiter les infections, dans un but prophylactique et/ou pour accélérer la croissance (afin d'augmenter les quantités de viande) est également inquiétant.⁹⁴ En Europe, la promotion de l'usage d'antibiotiques pour accélérer la croissance animale a été interdite en 2003.¹⁶⁴ Toutefois il reste encore de nombreux pays dans lesquels leur usage n'est pas régulé alors que le commerce mondial et les importants déplacements de populations à travers le monde sont autant de facteurs favorisant la diffusion des souches pathogènes et des gènes de résistance.¹⁶⁵

¹⁶³ Mindlin SZ, Soina VS, et al. Isolation of antibiotic resistance bacterial strains from East Siberia permafrost sediments. *Genetika*. 2008; 44:36-44.

¹⁶⁴ Official Journal of the European Union. Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of The Council of 22 September 2003 on Additives for use in Animal Nutrition. Available at: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:EN:PDF>.

¹⁶⁵ Nussbaum FV, Brands M, et al. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry—Exodus or Revival? *Angew Chem Int*. 2006; 45:5072–5129.

4.1.1 La résistance bactérienne

Dans les années 90 les espèces bactériennes à Gram positif étaient particulièrement inquiétantes. Elles représentent toujours une menace aujourd'hui, avec des cas de multi-résistances. Les souches concernées sont les bactéries du genre *Staphylococcus*, les streptocoques résistants à la méthicilline, les entérocoques résistants à la vancomycine et *Clostridium difficile* multi-résistant.⁹⁴

4.1.1.1 *Staphylococcus aureus*

Traditionnellement opportunistes et présentes parmi les souches communes du microbiote cutané, les souches de *Staphylococcus aureus* deviennent plus résistantes. Elles disposent d'un arsenal de protéines extracellulaires et de facteurs de défense tels que les hémolysines, les protéases, les hyaluronidases, et les entérotoxines (responsables des cas de gastro-entérites). Elles sont responsables d'infections chroniques associées au matériel médical. L'incidence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) est importante dans les cas de résistances observés en Europe et aux États-Unis. Cette bactérie serait responsable de 60 à 89 % des infections nosocomiales conduisant à 19 000 décès chaque année aux États-Unis.¹⁶⁶ Il a été avancé que SARM tuerait chaque année, aux États-Unis, plus de personnes à l'hôpital que le VIH/SIDA et la tuberculose combinés.¹⁶⁷

La menace que représentent les bactéries à Gram positif est bien connue et répandue. D'après le Réseau européen de Surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens (EARS-Net), les taux de résistances auraient tendance à se stabiliser, voire à diminuer pour certaines souches à gram positif ces dernières décennies.¹⁶⁸ Malheureusement en parallèle, alors que les efforts étaient concentrés sur ces pathogènes, une nouvelle menace est apparue avec une vague de bactéries à gram négatif multirésistantes.⁸⁹ Une étude européenne a mis en évidence la part grandissante de ces infections. Elles sont d'autant plus inquiétantes qu'il est difficile de franchir la

¹⁶⁶ Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science*. 2009; 325:1089–1093.

¹⁶⁷ Boucher HW, Talbot GH, et al. An Update from the infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009; 48:1–2.

¹⁶⁸ European centre for disease prevention and control. Communication from the commission to the european parliament and the council. Action plan against the rising threats from Antimicrobial Resistance. Available at: http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/docs/communication_amr_2011_748_en.pdf. Accessed July 2017.

membrane externe de ces pathogènes.¹⁶⁹ Leur structure et la présence de nombreuses pompes à efflux les rendent naturellement résistants à beaucoup d'antibiotiques. Les principales bactéries multi-résistantes sont *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* et plus récemment *Neisseria gonorrhoeae*.¹⁷⁰

4.1.1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie commensale, pouvant être pathogène opportuniste. Les souches pathogènes peuvent produire des toxines mortelles telles que la vérotoxine entérohémorragique, responsable du syndrome hémolytique et urémique et de complications rénales.¹⁷¹ La prévalence de souches résistantes à la 3^{ème} génération de céphalosporines, aux fluoroquinolones, et à la gentamycine est importante.¹⁷² Plus rare, mais retrouvées sur l'ensemble des continents, certaines souches d'*E. coli* ont acquis la métallo β -lactamase New Delhi leur conférant une résistance à l'ensemble des β -lactames y compris les carbapénèmes, à l'exception du monobactame aztréoname.^{173,174}

4.1.2 La résistance fongique

Ces dernières années, en médecine humaine, les principaux problèmes ont concerné la résistance acquise d'*Aspergillus fumigatus* aux azolés ainsi que la résistance des levures du genre *Candida* au fluconazole et plus récemment aux échinocandines.¹⁷⁵

4.1.2.1 Levure *Candida* sp.

La fréquence des infections causées par *Candida* sp. a augmenté ces dernières années. Elle est due à l'augmentation des populations à risques incluant les personnes transplantées, souffrant de cancers ou recevant des traitements immunosuppresseurs.

¹⁶⁹ European Medicine Agency. The bacterial challenge: time to react. A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents.. Accessed July 2017.

¹⁷⁰ Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant Bugs in the 21st Century--A Clinical Super-challenge. *N Engl J Med*. 2009; 360:439–443.

¹⁷¹ Kaper JB, Nataro JP, et al. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2:123–140.

¹⁷² Livermore DM, Hope R, et al. Non-susceptibility trends among Enterobacteriaceae from Bacteraemias in the UK and Ireland, 2001–06. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62(Suppl 2):41–54.

¹⁷³ Pfeifer Y, Witte W, Holfelder M, et al. NDM-1 Producing *Escherichia coli* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55:1318–1319.

¹⁷⁴ Nordmann P, Poirel L, et al. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66:689–692.

¹⁷⁵ Guillot J, Dannaoui. La résistance aux antifongiques : importance en médecine humaine et vétérinaire. *Bull. Acad Vét France*. 2005; 168: 314–319.

En Europe, les espèces du genre *Candida* sont parmi le « top 10 » des isolats fréquemment détectés en milieu hospitalier. *C. albicans* n'est plus la seule espèce incriminée puisque les pressions de sélections exercées par l'Homme ont entraîné l'émergence de nouvelles espèces étant autrefois bien moins virulente (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*).¹⁷⁶ La résistance acquise aux composés azolés chez les souches du genre *Candida* est un phénomène ancien. Les mécanismes de résistance sont variés et répartis en quatre groupes¹⁰⁶ :

- modification de la cible (14- α -déméthylase) par mutation génétique,
- surproduction de la cible,
- phénomène d'efflux par surproduction des transporteurs diminuant la concentration en antifongique au sein de la cellule,
- altération des étapes de la voie de biosynthèse de l'ergostérol.

Ces différents mécanismes ne sont pas exclusifs et peuvent se cumuler chez un même individu.

Les principaux cas de résistance aux échinocandines sont également observés pour les souches du genre *Candida*, avec en premier lieu *C. albicans* et *C. glabrata*. Actuellement le seul mécanisme de résistance démontré chez ces souches correspond à une mutation au niveau des gènes codant la cible (β -1-3-D glucane synthase).¹⁰⁶

Les principaux mécanismes de résistances aux différentes classes d'antifongiques sont présentés dans le **Tableau 1**.

Bien que ces dernières années aient été riches en termes de connaissances sur les mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques et plus généralement sur le métabolisme des champignons pathogènes, les phénomènes de résistances croissants restent une inquiétude de santé publique. Dans un proche avenir, des outils de diagnostic à haut débit pourraient être utilisés au cours du traitement des infections fongiques pour détecter et limiter les résistances en ajustant les stratégies thérapeutiques.⁹⁸

¹⁷⁶ Sanguinetti M, Posteraro B, et al. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*. 2015; 58:2–13.

Tableau 1: Nature, cible, mode d'action et mécanisme de résistances aux principaux antifongiques utilisés chez l'Homme¹⁷⁷

Agent antifongique	Mode d'action et cible	Mécanismes de résistance
Polyènes	Liaison à l'ergostérol	Absence d'ergostérol (mutation ERG3 et ERG6) Diminution de la concentration cellulaire en ergostérol
Azolés	Inhibition cytochrome P450 : 14- α -lanosterol déméthylase (ERG11) et la sterol Δ^{22} desaturase (ERG5)	Transporteurs membranaires Diminution de l'affinité (mutation) Altération voie de biosynthèse ergostérol
Fluoro-pyrimidines	Inhibition synthèse acide nucléiques	Défaut de la cytosine perméase Défiance ou manque d'enzymes impliqués dans le métabolisme de la 5-FC Dérégulation de la voie de biosynthèse de la pyrimidine
Echinocandines	Inhibition de la β -1,3 glucane synthase (FKKS1 & 2)	Altération affinité échinocandines / β -1,3 glucane synthase
Allylamines	Inhibition de la squalène epoxydase (ERG1)	Inconnu
Morpholines	Inhibition de la sterol Δ^{14} reductase (ERG24) et de la Δ^{7-8} isomerase (ERG2)	Inconnu

4.2 La résistance aux insecticides

L'usage intensif d'insecticides durant le siècle dernier et encore aujourd'hui pour la protection des cultures et la lutte anti-vectorielle a engendré une forte pression de sélection, qui s'est traduite par l'apparition de résistances.

Les principaux mécanismes de résistances relevés chez les insectes sont au nombre de quatre :

- Résistance comportementale

Une exposition prolongée à un agent insecticide peut entraîner des modifications dans le comportement de l'insecte. La modification comportementale n'a pas la même "importance" que la résistance physiologique, mais est considérée comme un facteur contribuant au caractère de résistance. Ainsi, en réponse à un stimulus négatif, un insecte peut cesser la nutrition sur un substrat infecté et/ou se déplacer dans des aires non contaminées. Cette dernière caractéristique est plus envisageable chez les insectes volants et notamment les moustiques. Pour exemple, une étude sur les effets irritants

¹⁷⁷ Tenson T, Lovmar M, et al. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol.* 2003; 330:1005–1014.

des résidus de DDT a été effectuée sur *Anopheles quadrimaculatus*. Les femelles ont montré un phénomène d'irritation peu de temps après avoir été en contact avec les surfaces traitées, cela a provoqué une réponse d'échappement rapide d'une maison avant la prise du repas de sang.¹⁷⁸ La répulsion peut être directe, par contact, ou spatial, lorsque l'insecte fuit une zone traitée par un insecticide.^{179,180}

- Résistance à la pénétration

Les insectes résistants présentent une absorption moindre des insecticides en comparaison de ceux dits sensibles. Ce mécanisme apparaît lorsque la barrière que forme la cuticule de l'insecte (ou la paroi du tube digestif) empêche ou ralentit la pénétration de l'agent insecticide.¹⁸³

Dans une étude menée chez le moustique *Anopheles funestus*, des mesures de l'épaisseur de la cuticule ont été réalisées. Les résultats ont démontré qu'une variété résistante à la perméthrine présentait une cuticule plus épaisse de 10 %.¹⁸¹ D'autres études ont mis en évidence ce mode de résistance chez la mouche domestique (*Musca domestica*), la teigne (*Plutella xylostella*) ou encore la noctuelle de la tomate (*Helicoverpa armigera*).¹⁸²

- Résistance métabolique

Il s'agit du mécanisme le plus commun, efficace sur un large spectre d'insecticides. Ce mécanisme s'appuie sur la machinerie enzymatique des insectes leur permettant de déstructurer ou détoxifier les agents insecticides. Ce mécanisme confère un haut niveau de résistance aux insectes.¹⁸³ Il est généralement admis que le système de détoxification des insectes est issu de leur longue et étroite coévolution avec les plantes. D'ailleurs

¹⁷⁸ Gahan JB, Lindquist AW. DDT residual sprays applied in buildings to control *Anopheles quadrimaculatus*. *J Eco Ent.* 1945; 38:223–230.

¹⁷⁹ Roberts DR, Chareonviriyaphap T, et al. Methods of testing and analyzing excito-repellency responses of malaria vectors to insecticides. *J Am Mosq Cont Assoc.* 1997; 13:13–17.

¹⁸⁰ Chareonviriyaphap T, Roberts DR, et al. Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus*, a malaria vector in the Americas. *J Am Mosq Cont Assoc.* 1997; 13:171–183.

¹⁸¹ Wood O, Hanrahan S, et al. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasit Vectors.* 2010; 3:67.

¹⁸² Ahmad M, Denholm I, et al. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Manag Sci.* 2006; 62:805–810.

¹⁸³ IRAC. Insecticide Resistance Action Committee. Résistance mechanisms. <http://www.irac-online.org/about/resistance/mechanisms/> (Accessed August 2017).

plusieurs enzymes sont associées à la détoxification de toxines végétales chez les insectes.¹⁸⁴

- Résistance au niveau du site cible

Il s'agit du second mécanisme le plus communément rencontré chez les insectes. Les insecticides agissent en grande majorité sur un site cible spécifique, généralement au niveau du système nerveux (pour les OP, carbamates, pyréthrinoides, néonicotinoïdes). Le site d'action peut être modifié de sorte que l'insecticide ne se lie plus efficacement.¹⁸³ Dans la plupart des cas, ce type de résistance s'explique par la présence d'une mutation qui entraîne une substitution d'un ou plusieurs acides aminés dans la séquence protéique de la cible de l'insecticide.¹⁸⁵

La résistance d'un individu face à un agent insecticide est évaluée sur la base d'essais biologiques, biochimiques et moléculaires. Les phénomènes de résistance multiple ne sont pas rares, un même individu pouvant exprimer plusieurs des mécanismes cités plus haut.

4.3 Situation actuelle et mesures

Vers une ère post-antibiotique... ?

Le développement de nouveaux agents antimicrobiens a fortement diminué ces dernières décennies.^{89,186} Les derniers agents découverts appartiennent aux classes déjà connues et sont donc soumis aux mêmes mécanismes de résistance que les précédents composés utilisés.¹⁶⁶ Depuis le début des années 1960, seules quatre nouvelles classes d'antibiotiques ont été développées et aucune n'a eu un impact conséquent sur la lutte antibactérienne. Le marché des antibiotiques est toujours dominé par les premières classes découvertes.¹⁸⁹ Ces 30 dernières années, la majeure partie des antimicrobiens mis sur le marché furent semi-synthétiques. En comparaison, la proportion de composés synthétiques est minime avec les sulfonamides, quinolones, oxazolidinones et

¹⁸⁴ Despres L, David JP, et al. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol Evol.* 2007; 22:298–307.

¹⁸⁵ ffrench-Constant RH, Daborn PJ, et al. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet.* 2004; 20:163–170.

¹⁸⁶ Spellberg B, Powers JH, et al. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin Infect Dis.* 2004; 38:1279–1286.

diarylquinolines comme seuls exemples. A l'exception des diarylquinolines, tous ont été découverts hors des programmes spécifiques de recherche d'antibiotiques. Pour exemple les sulfonamides étaient originalement développés pour la recherche de colorants, les quinolones étaient des intermédiaires de synthèse de la chloroquine (antipaludique) et les oxazolidinones étaient destinés à traiter les problèmes de feuillage chez les plantes.¹⁸⁹

L'explication réside en partie par la réduction importante des projets de recherche visant à découvrir de nouveaux agents antimicrobiens. Parmi les 18 plus grandes compagnies pharmaceutiques, 15 ont abandonné la recherche d'antibiotiques. Leur développement n'est plus considéré comme un investissement économiquement intéressant.¹⁸⁷ Utilisés sur des périodes relativement courtes, en traitement curatif, ou en tant qu'antibiotiques de réserves, ils ne sont pas aussi rentables que les médicaments traitant les maladies chroniques tels que le diabète et les troubles cardio-vasculaires ou psychiatriques.¹⁸⁸ L'autre facteur est le coût relativement peu élevé des antimicrobiens en comparaison des traitements anticancéreux dont le coût peut atteindre des centaines de milliers de dollars.^{86,187} A cela s'ajoute les mesures d'austérité mise en place par certains pays visant à une meilleure gestion de la délivrance de médicaments, décourageant ainsi les industriels.¹⁸⁹

De nombreuses organisations de santé publiques ont décrit la situation comme étant critique, avec un « scénario catastrophe » qui pourrait avoir des conséquences planétaires.¹⁹⁰ Bon nombre des progrès récents de la médecine (transplantation d'organes, chimiothérapie anticancéreuse, etc.) nécessite l'utilisation d'antimicrobiens pour prévenir et traiter les infections qui peuvent survenir au cours des traitements. Sans molécules efficaces, même la chirurgie classique et les opérations bénignes pourraient devenir des procédures à haut risque.

Le grand défi aujourd'hui et de rechercher de nouveaux traitements, en particulier de nouveaux antimicrobiens, avec des structures originales et/ou présentant des modes d'actions innovants permettant de contrer les mécanismes de résistance.

¹⁸⁷ Bartlett JG, Gilbert DN, et al. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin Infect Dis*. 2013; 56:1445–1450.

¹⁸⁸ Piddock LJ. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? *Lancet Infect Dis*. 2012; 12:249–253.

¹⁸⁹ Gould IM, Bal AM. New antibiotic agents in the pipeline and how they can overcome microbial resistance. *Virulence*. 2013; 4:185–191.

¹⁹⁰ Viswanathan VK. Off-label abuse of antibiotics by bacteria. *Gut Microbes*. 2014; 5:3–4.

Vers la lutte biologique intégrée...

Selon la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture), les pestes agricoles auraient de sérieux effets délétères sur la production agricole mondiale. Ils seraient responsables d'une diminution des rendements de 20 à 40 % chaque année. Outre l'impact agricole, nombre d'insectes sont vecteurs de maladies. Les principales maladies à transmission vectorielle représentent environ 17% de la charge mondiale estimée des maladies transmissibles et sont responsables de plus de 700 000 décès annuels.¹⁹¹ Dans un rapport de l'OMS datant de 2015, il est signalé que pour le seul cas du paludisme, dont le principal vecteur est le moustique du genre *Anopheles*, 60 pays ont signalé une résistance à au moins une des quatre classes d'insecticides. De ceux-ci, 49 ont signalé une résistance à deux ou plusieurs classes d'insecticides.¹⁹²

Les dernières années ont connu des progrès sans précédent dans la prévention et le contrôle des vecteurs de maladies dans les zones à risque. Cela a été principalement le résultat d'une lutte anti-vectorielle qui s'est traduite par la pulvérisation intensive d'insecticides, la distribution d'équipements traités et l'utilisation de larvicides. Ces progrès sont toutefois fragiles et aujourd'hui menacés. La transmission de ces maladies évolue rapidement, couplée à d'autres difficultés d'ordre biologique, comme la résistance des vecteurs aux insecticides et l'évolution des souches d'agents pathogènes. Jamais la nécessité d'une approche globale de lutte n'a été aussi impérieuse. Les pesticides utilisés en agriculture présentent les mêmes cibles que ceux utilisés dans la lutte anti-vectorielle. Les mécanismes de résistances ne peuvent être anticipés et il n'est pas étonnant de voir le contrôle de nombreux insectes nuisibles nous échapper. Les progrès technologique en génomique, métabolomique et en biologie structurale permettent toutefois de repenser notre développement des insecticides.¹⁹³ Aujourd'hui, nous misons davantage sur une stratégie de contrôle rationnel. Cela implique premièrement de développer des insecticides plus spécifiques, conçus en fonction d'un site cible précis et bien connu d'un point de vue moléculaire. Deuxièmement le

¹⁹¹ OMS. Projet d'action mondiale pour lutter contre les vecteurs 2017-2030. http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030-fre.pdf (Accessed August 2017).

¹⁹² OMS. Résistance aux insecticides. http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/insecticide_resistance/fr/ (Accessed August 2017).

¹⁹³ Coz J. Utilisation de la génétique dans le contrôle des espèces d'insectes vecteurs de maladies humaines. In : *Medecine Tropicale*. 1978 ; 38:659–665.

métabolisme de l'insecticide par l'insecte doit être étudié en détail, particulièrement les enzymes qui pourraient conférer une résistance chez l'insecte.¹⁹⁴

Bien que le marché des biopesticides soit très en dessous de celui des produits phytosanitaires chimiques, il est en constante croissance. Même si, employés seuls, les biopesticides sont généralement moins efficaces à court terme que leurs homologues chimiques, ils présentent de nombreux avantages écologiques qui ne peuvent pas être ignorés.¹⁵⁴ Utilisés dans une stratégie de lutte intégrée en combinaison avec les pesticides chimiques, ils permettent de limiter la quantité d'intrants ainsi que l'apparition de nuisibles résistants.¹⁵⁴

En France, des mesures sont prises pour encadrer des produits phytosanitaires. Ainsi, le plan « Écophyto 2018 » débattu lors du Grenelle Environnement de 2007, vise à réduire de 50% la quantité de produits phytosanitaires d'origine chimique d'ici 2018.^{195,196}

¹⁹⁴ Perry T, Batterham P, et al. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochem Mol Bio.* 2011; 41:411–422.

¹⁹⁵ Zhang W, Jiang F, et al. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proc Int Acad Ecol Environ Sci.* 2011; 1:125–144.

¹⁹⁶ Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation. Le plan Ecophyto 2018. <http://agriculture.gouv.fr/ecophyto> (Accessed August 2017).

Résultats

1 Résultats préliminaires

1.1 Récolte et identification du matériel biologique

Les insectes infectés étudiés au cours de ce projet de recherche ont été récoltés sur le territoire français et fournis par nos collaborateurs de différents laboratoires et institutions (Tableau 2).

Le premier lot d'insectes obtenu provient de Guyane française. Les récoltes ont été effectuées en juin 2013 dans la commune de Montsinéry à la crique Coco et à Kourou dans la zone de Wayabo (Figure 35). Les insectes ont été récoltés sur différentes plantes, et présentaient des contaminations visibles en surface par des micro-organismes entomopathogènes. Les insectes ont été identifiés par S. Brulé et F. Beneluz, membre de la « Société Entomologique de Guyane ».

Le second lot de matériel biologique a été fourni par Alexandra Magro de l'ENSFEA (Ecole Normale Supérieure de Formation de l'Enseignement Agricole). Il s'agit de coccinelles d'élevage contaminées du genre *Hipodammia undecimnotata*.

Enfin nous avons obtenu des souches fongiques d'entomopathogènes isolées par Christian Lechat (ASCOFrance), à partir de diverses espèces d'insectes.

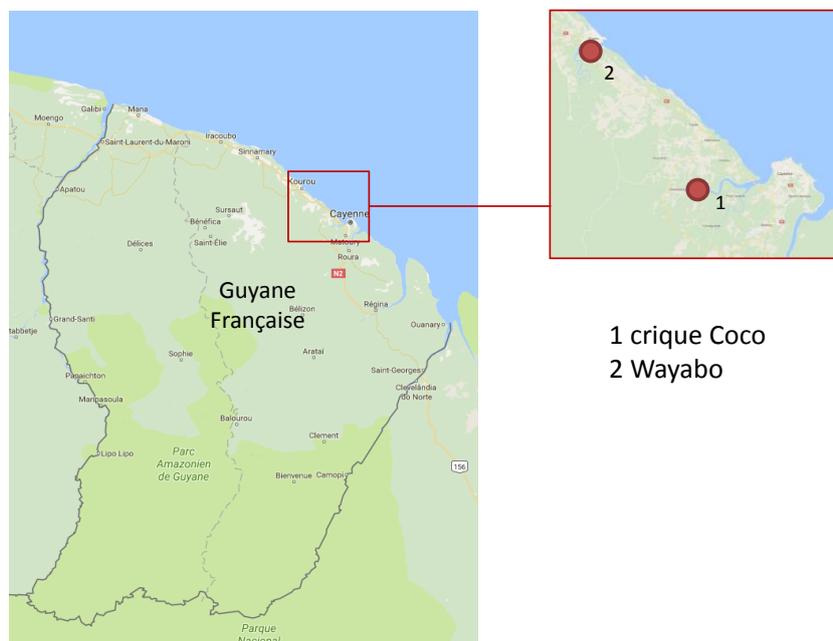


Figure 35: Zone de récolte du matériel biologique en Guyane Française

Tableau 2 : Identification et lieu de collecte du matériel biologique

Identification de l'insecte	Lieu de collecte
<i>Acalymma bivittula</i> (Chrysomelidae, Galerucinae)	Montsinéry - Crique Coco
<i>Diabrotica speciosa</i> (Chrysomelidae, Galerucinae)	Montsinéry
<i>Chrysomelidae</i> (Galerucinae type <i>Diabrotica</i> ?)	Montsinéry
<i>Acalymma bivittula</i> (Chrysomelidae, Galerucinae)	Montsinéry
Homoptera, Sternorrhyncha	Kourou - Wayabo
<i>Cerotoma arcuatus</i> (Chrysomelidae, Galerucinae)	Montsinéry
Vespidae, Hymenoptera	Montsinéry
Diaspididae	Montsinéry
Sternorrhyncha, Homoptera	Montsinéry
<i>Acalymma bivittula</i> (Chrysomelidae, Galerucinae)	Montsinéry
<i>Hippodamia undecimnotata</i>	Toulouse
Larves non identifiées	France métropolitaine
<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	France métropolitaine
<i>Dasyphora pratorum</i>	France métropolitaine
<i>Paravespula vulgaris</i>	France métropolitaine
<i>Araignée non indentifiée</i>	France métropolitaine

A l'issue des récoltes, les insectes ont été conservés au congélateur à -80°C dans un mélange glycérol-eau 1:1 permettant leur conservation.

1.2 Isolement des micro-organismes associés aux insectes

A l'arrivée des échantillons biologiques au laboratoire, les micro-organismes associés aux insectes ont été isolés. Ainsi les insectes contaminés ont été déposés sur une boîte de Petri contenant un milieu de culture nutritif ou mis en eau stérile afin de préparer des suspensions. Ces suspensions ont été diluées pour permettre d'isoler plus facilement les différentes colonies de micro-organismes.

Afin de faciliter l'isolement des micro-organismes, différents milieux de culture ont été utilisés. Le milieu Mueller Hinton (MH) a été utilisé pour la culture de bactéries, le milieu Sabouraud pour l'isolement de champignons et le milieu Potato Dextrose Agar (PDA), plus généraliste, a été utilisé pour la culture et le repiquage régulier des souches et leur conservation.

Chaque colonie isolée a été repiquée individuellement et cryo-conservée dans un mélange glycérol/eau (1:1) à -80°C.

Au total 47 micro-organismes ont pu être isolés au moyen de ces deux techniques. A cela s'ajoute 8 souches fongiques transmises par Christian Lechat. La diversité morphologique des souches obtenues est observable sur la **Figure 36**.



Figure 36: Photographie d'une partie des souches microbiennes isolées (© S.Touré)

1.3 Identification des micro-organismes

L'identification des micro-organismes a été effectuée par amplification et séquençage de régions spécifiques du génome. Pour cela les échantillons cryo-conservés ont été remis en culture afin d'extraire l'ADN génomique qui a été amplifié par polymérisation en chaîne (PCR). Le séquençage des régions ITS1 et ITS4 a permis l'identification des champignons, et celui de la région 16SF1 a permis l'identification des souches bactériennes. Les séquences obtenues ont été comparées avec celles répertoriées dans la banque de gène NCBI afin d'identifier ces dernières. Les séquences ont été considérées comme similaires lorsque le pourcentage d'homologie était supérieur à 97,5%.

Les résultats du séquençage ont permis d'identifier 40 champignons et 15 bactéries. Deux souches n'ont pu être identifiées car elles n'ont pas repoussé lors de la remise en culture.

Les micro-organismes sont classés par ordre (Figure 37). Chez les champignons nous n'observons pas une grande diversité puisque les isolats sont répartis en quatre ordres. Un grand nombre de souches appartient à l'ordre des Hypocreales (17 isolats, soit plus de 42%). L'ordre des Hypocreales est connu pour comprendre de nombreux champignons parasites d'insectes dont les genres *Beauveria* et *Metharizium*. Les souches ayant été isolées à partir d'insectes contaminés par des champignons entomopathogènes, il apparait cohérent de retrouver un grand nombre d'isolats appartenant à cette ordre. Le second ordre le plus représenté est celui des Eurotiales (10 isolats, 25%). Cet ordre est un des plus répandu et abondant. Il comprend des

champignons se développant sur la matière en décomposition, il n'est donc pas étonnant d'en retrouver dans notre étude.

En ce qui concerne les bactéries, nous observons une diversité plus importante, bien que le nombre d'isolats obtenu soit proportionnellement moins important que celui obtenu pour les champignons. Plus d'un tiers des bactéries isolées appartient à l'ordre des Pseudomonadales (40% des souches bactériennes). Cet ordre comprend les bactéries à Gram négatif du genre *Pseudomonas* et *Acinetobacter*, dont certaines espèces sont pathogènes pour l'homme (Cf. Etat de l'art). Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont connues pour leur grande diversité métabolique leur permettant de s'adapter à de nombreuses niches écologiques, incluant le sol, l'eau, les plantes et les animaux.¹⁹⁷ Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont des bacilles (ou coccobacilles) ubiquitaires, fréquemment retrouvés dans l'environnement. Elles sont également connues comme composant la flore commensale de la peau de l'homme. Au sein du genre, *A. baumannii* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée en milieu hospitalier, où elle est la cause d'un nombre important d'infections nosocomiales.¹⁹⁸ Le second ordre bactérien représenté est celui des Rhizobiales (20%). Cet ordre comprend des bactéries symbiotes des racines de plantes, leur apportant ainsi divers bénéfices. Ils sont connus pour être associés aux mousses et lichens également.¹⁹⁹

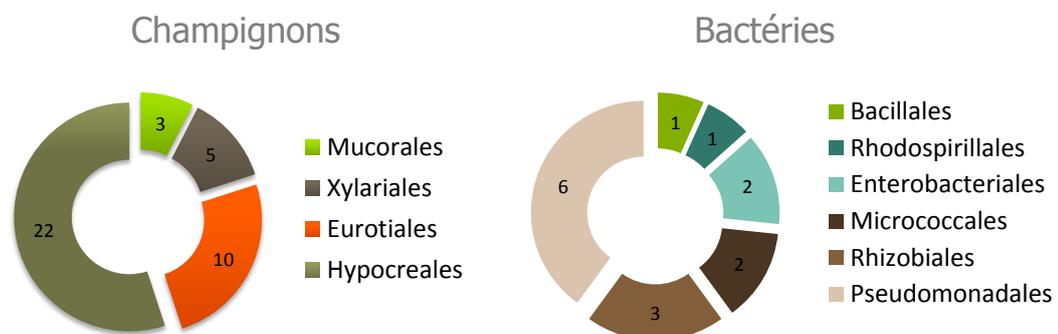


Figure 37: Nombre d'isolats obtenus, par Ordre

¹⁹⁷ Ozen AI, Ussery DW. Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*? *Microb Ecol.* 2012; 63:239–248.

¹⁹⁸ Figueiredo S. Thèse. *Acinetobacter* spp. et réservoir de gènes de carbapénèmases. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français.

¹⁹⁹ Erlacher A, Cernava T, et al. Rhizobiales as functional and endosymbiotic members in the lichen symbiosis of *Lobaria pulmonaria* L. *Front Microbiol.* 2015; 6:53.

2 Criblage biologique des extraits

2.1 Cibles biologiques

L'objectif de notre projet est de découvrir de nouveaux composés insecticides et/ou antimicrobiens à partir de micro-organismes associés aux insectes. Nous avons donc choisi plusieurs cibles biologiques pour mener à bien le criblage des extraits. Ainsi, pour la recherche d'insecticides, nous avons orienté nos recherches dans un objectif de valorisation en santé publique et réalisé les essais sur les larves du moustique *Aedes aegypti*, insecte vecteur de nombreuses maladies. Quant aux essais antimicrobiens, ils ont été réalisés sur différents micro-organismes pathogènes pour l'Homme : *Staphylococcus aureus*, et la souche résistante à la méthicilline (SARM), *Candida albicans*, et *Trichophyton rubrum*.

2.1.1 *Aedes aegypti* : un moustique vecteur d'arboviroses

2.1.1.1 Vecteurs de maladies

Les moustiques du genre *Aedes* sont les principaux vecteurs de plusieurs arboviroses, incluant le virus de la dengue, du Chikungunya, de la fièvre jaune et plus récemment le virus Zika.

Le virus se transmet à l'homme par la piqûre de femelles infectées, lesquelles acquièrent principalement le virus en se nourrissant du sang d'une personne infectée. Dans l'organisme du moustique, le virus infecte d'abord l'intestin moyen et se propage ensuite aux glandes salivaires en 8 à 12 jours. Après cette période d'incubation, il peut être transmis à l'homme lors de piqûres exploratoires ou de repas de sang.²⁰⁰

La dengue et le Chikungunya sont devenus des problèmes de santé publique croissants au cours des cinquante dernières années. Aujourd'hui, le risque d'infection par la dengue touche la moitié de la population mondiale. Selon de récentes estimations, on compterait 390 millions de cas par an dont 96 millions présentent des manifestations cliniques.²⁰¹ Non seulement le nombre de cas augmente à mesure que la maladie se propage à de nouvelles zones mais l'on assiste également à des crises épidémiques : en 2012, dans l'archipel de Madère (Portugal), en 2013 en Floride (Etats-Unis) et à Yunnan (Chine), en

²⁰⁰ OMS. Lutte contre la dengue. <http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/fr/> (Accessed August 2017).

²⁰¹ Bhatt S, Gething PW, et.al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496:504–507.

2015 à New Delhi (Inde). Parallèlement, la dengue a continué de sévir dans de nombreux pays et îles du Pacifique. L'impact de la maladie sur la santé humaine et sur l'économie mondiale est très inquiétant.²⁰² Les épidémies de Chikungunya, qui étaient précédemment limitées à l'Afrique et à l'Asie, ont récemment été signalées dans les Caraïbes, en Amérique du Sud et en Europe.²⁰³

2.1.1.2 Distribution du moustique

Aedes aegypti serait originaire d'Afrique. Il aurait été introduit en Amérique via des barils d'eau transportés sur les navires durant les premières explorations européennes et la colonisation. Il se serait alors propagé dans les régions tropicales et subtropicales. On le retrouve sur le globe à des latitudes comprises entre 35° nord et 35° sud. Il est toutefois retrouvé à certaine latitude plus élevée, notamment en saison chaude car il ne survit pas à l'hiver (Figure 38).²⁰⁴

Les déplacements de population couplés aux phénomènes de réchauffement climatique ont largement contribué à la distribution de ce moustique à travers les continents.

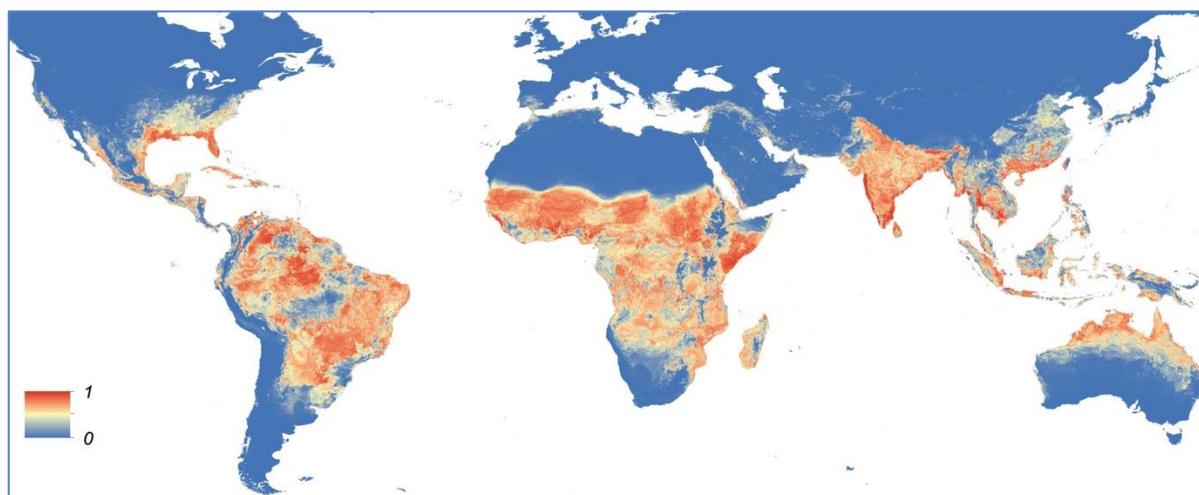


Figure 38: Modèle de distribution mondial d'*Aedes aegypti*. La carte représente la probabilité d'occurrence du moustique (de 0 en bleu à 1 en rouge)²⁰³

²⁰² OMS. Dengue et dengue sévère. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/fr/> (Accessed August 2017).

²⁰³ Kraemer MU, Sinka ME, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Elife*. 2015; 30: e08347.

²⁰⁴ Nelson MJ. *Aedes aegypti* : biology and ecology. Pan American Health Organization. 1986.

2.1.1.3 Traitement et prévention

Un certain nombre de facteurs contribuent à l'incapacité actuelle de prévenir ou de contrôler les maladies transmises par les moustiques. Bien qu'un vaccin efficace existe contre la fièvre jaune, sa distribution est problématique dans les régions où surviennent les épidémies.²⁰⁵ De plus, aucun traitement curatif n'existe à ce jour pour traiter le Chikungunya et la dengue. Début 2016 le laboratoire Sanofi Pasteur a mis au point un vaccin tétravalent contre la dengue (Dengvaxia®), toutefois les épidémies de dengue continuent de se répandre.

La prise en charge thérapeutique de ces pathologies repose sur des mesures visant à limiter les symptômes. **Actuellement un des seuls moyens pour combattre la transmission des virus consiste à lutter contre les vecteurs de ces maladies par divers moyens tels que la destruction des gîtes larvaires, l'épandage et la pulvérisation d'insecticide**, ou encore l'introduction d'espèces prédatrices et l'utilisation d'équipements imprégnés d'insecticide par les populations (moustiquaires). Une autre stratégie consiste à relâcher des moustiques transgéniques dont la progéniture n'atteint pas l'âge adulte afin de faire diminuer les populations.²⁰⁶

2.1.2 *Micro-organismes pathogènes*

2.1.2.1 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus est une bactérie coque (Gram positif), commensale de la flore cutanée qui colonise particulièrement les muqueuses externes (30 à 50 % de la population est porteur sain de staphylocoque). Elle tient son nom du fait de la couleur or des colonies. La souche a été décrite pour la première fois par Louis Pasteur en 1880. La bactérie est impliquée dans des pathologies variées (infections cutanées, alimentaires, plus rarement septicémie) présentant des degrés de gravité divers. Il s'agit du premier agent responsable d'infections nosocomiales et de nombreuses souches sont devenues résistantes aux antibiotiques (méthicilline et vancomycine).

2.1.2.2 Candida albicans

²⁰⁵ Clemons A, Haugen M, et al. *Aedes aegypti*: an Emerging Model for Vector Mosquito Development. *Cold Spring Harb Protoc.* 2010.

²⁰⁶ Medlock J, Luz PM, et al. The impact of transgenic mosquitoes on dengue virulence to humans and mosquitoes. *Am Nat.* 2009; 174:565–577.

Candida albicans est une levure microscopique, habituellement inoffensive que l'on retrouve fréquemment au niveau des voies génitales, du tube digestif, de la peau, et de la bouche sans effet pathologique. Les infections (candidoses) provoquées par ce champignon surviennent souvent chez les patients immunodéprimés. Les lésions surviennent généralement au niveau des muqueuses.

2.1.2.3 *Trichophyton rubrum*

Trichophyton rubrum est un champignon filamenteux dermatophyte. Il est le principal responsable de dermatophytose des pieds (pieds d'athlète – tinea pedis) et des ongles (onychomycose – *Tinea unguium*).

La souche utilisée au cours de notre projet est un isolat clinique, dont l'espèce a été confirmée par séquençage.

2.2 Résultats du criblage biologique

Chacun des micro-organismes isolés a été remis en culture sur 10 boîtes de Petri et laissé à incuber à 28°C durant 15 jours pour les champignons et 7 jours pour les bactéries. Les boîtes (micro-organismes et milieu de culture) ont ensuite été mises à macérer dans de l'acétate d'éthyle afin d'extraire les métabolites secondaires.

Les extraits à l'acétate d'éthyle (AcOEt) obtenus ont ensuite été criblés pour leur activité insecticide d'une part, et leur activité antimicrobienne d'autres part, respectivement sur *Aedes aegypti* et plusieurs micro-organismes pathogènes pour l'Homme.

2.2.1 *Activité insecticide*

Nous avons premièrement criblé les extraits sur larves d'*Aedes aegypti*. Les essais ont été effectués à 100 ppm pour la majorité des souches, et à 10 ppm pour certaines souches ne produisant que très peu d'extrait.

Les extraits considérés comme larvicide sont ceux pour lesquels un taux de mortalité supérieur à 70% a été mesuré au bout de 24h à 100 ppm.

Par la suite, nous avons sélectionné 13 extraits larvicides pour effectuer des essais sur moustiques adultes afin d'évaluer leur toxicité et leur effet irritant. Les essais sur moustiques adultes ont été effectués en Guyane française, au sein de « l'Unité de contrôle et d'adaptation des vecteurs » de l'Institut Pasteur de Guyane.

2.2.2 Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits a été évaluée par mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les essais permettent d'évaluer la plus faible concentration d'une substance permettant d'inhiber la croissance d'un organisme. Pour le criblage nous avons effectué une gamme de CMI de 256 à 8 µg/mL.

Les essais antimicrobiens ont été menés sur 4 souches pathogènes disponibles au laboratoire : les bactéries *Staphylococcus aureus* ATCC29213 et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) ATCC33591, la levure *Candida albicans* ATCC10231, et le champignon dermatophyte *Trichophyton rubrum* SNB-TR1.

Les résultats du criblage sont présentés dans le tableau 3. Nous avons considéré comme actifs les extraits pour lesquels la CMI était ≤ 32 µg/mL.

2.2.3 Activité cytotoxique

La cytotoxicité des extraits a été évaluée sur différentes lignées cellulaires : les cellules cancéreuses KB (cellules de carcinome du col utérin), MDA 231 (cellules de mélanomes) et les cellules saines MRC5 (cellules de poumon fœtal humain de 14 semaines). Les essais ont été menés à 1 et 10 µg/mL.

L'ensemble des résultats biologiques obtenus suite au criblage sont disponibles dans le **Tableau 3**.

Tableau 3: identification des micro-organismes et activité insecticide, antimicrobienne et cytotoxicité des extraits à l'acétate d'éthyle

Code (SNB-...)	Identification	Taux de mortalité (%)				MIC (µg/mL)				Cytotoxicité (%)					
		Activité larvicide 24h		Toxicité adulte		<i>S. aureus</i>	SARM	<i>C. albicans</i>	<i>T. rubrum</i>	KB		MDA231		MRC5	
		10 ppm	100 ppm	24h	48h					1µg/mL	10µg/mL	1µg/mL	10µg/mL	1µg/mL	10µg/mL
VECD4A	<i>Pestalotiopsis spp</i>	1,0				> 256	> 256		> 256	42	43	3	21	10	12
VECD4B	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	2,0				> 256	> 256	> 256	64	40	45	8	8	10	3
VECD4C	<i>Pestalotiopsis spp</i>	34		5,5	6,9	>256	>256			24	44	14	16	30	30
VECD6A	<i>n, d</i>		31,9			>256	32	128	256						
VECD6B	<i>Beauveria bassiana</i>	0,9				>256	128	32	> 256						
VECD6C	<i>Penicillium rolfsii</i>		30,0			> 256	> 256	<8	64	55	66	9	46	19	24
VECD6D	<i>Trichoderma spp</i>		27,0			> 256	> 256	256	> 256	57	62	15	28	36	51
VECD6E	<i>Beauveria bassiana</i>		54,1			>256	64	>256	> 256						
VECD11A	<i>Beauveria bassiana</i>	2,0				>256	>256			48	50	40	47	10	37
VECD11B	<i>n, d</i>	2,0				> 256	> 256	> 256	> 256	42	55	12	20	39	45
VECD11D	<i>Mucor spp</i>		77,0	2,7	8,2	64	16	> 256	256	20	42	9	26	22	28
VECD11E	<i>Penicillium spp</i>		75,8	2,9	7,2	> 256	> 256	> 256	32						
VECD11F	<i>Penicillium spp</i>					> 256	> 256	> 256	> 256	38	66	21	98	23	30
VECD11G	<i>Penicillium simplicissimum</i>		70,3	0	0	>256	64	256	128						
VECD13A	<i>Mucor spp</i>		80,0	4,1	4,1	> 256	> 256	> 256	> 256	44	44	17	16	16	22
VECD13B	<i>Neosartorya sp</i>	13,8				128	32		> 256	68	72	41	42	52	67
VECD13C	<i>Penicillium oxalicum</i>	0				> 256	> 256	128	> 256	31	42	23	28	3	2
VECD13D	<i>Methylobacterium populi</i>	2,2					> 256	> 256	> 256						
VECD13E	<i>Hirsutella citriformis</i>	3,0				>256	>256								
VECD14A	<i>Curtobacterium spp</i>	3,2				>256	>256			42	46	15	25	44	62
VECD14B	<i>Pantoea spp</i>	7,7	97,2	1,4	4,2	> 256	> 256	> 256	16	26	36	9	13	20	18
VECD14C	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus aryabhatai</i>		18,6			> 256	>256		> 256						
VECD14D	<i>Pestalotiopsis spp</i>	0				>256	>256			43	44	10	25	5	12
VECD14E	<i>Pestalotiopsis theae</i>	8,2	87,8	1,4	4,2	> 256	> 256	256	128	6	18	11	42	19	27

VECD14G	<i>Methylobacterium spp</i>	3,0								12	23	23	30	22	41
VECD15A	<i>Asaia sp</i>	2,1	75,5	1,3	3,8	> 256	> 256	> 256	> 256	26	26	7	7	31	36
VECD16A	<i>Penicillium citrinum</i>		67,0			> 256	> 256	128	256	31	46	16	16	25	21
VECD16B	<i>Beauveria bassiana</i>	4,0				> 256	> 256		> 256	17	41	16	17	0	50
ST1C	<i>Fusarium spp</i>		27,1			> 256	> 256	> 256	> 256	0	0	15	19	0	0
ST2C	<i>Pseudomonas spp</i>	11,0				> 256	> 256	> 256	> 256	0	38	0	16	0	0
ST3C	<i>Pseudomonas spp</i>		12,2			128	64	> 256	128						
ST4C	<i>Lecanicillium spp</i>		56,6			> 256	> 256	> 256	> 256	0	0	0	9	0	0
ST5C	<i>Pseudomonas spp</i>	3,1				> 256	> 256	> 256	32	0	0	0	0	0	0
ST6C	<i>Pseudomonas spp</i>	0				> 256	> 256	> 256	> 256	64	100	0	96	29	100
ST7C	<i>Fusarium acuminatum</i>		37,9							53	100	0	96	46	100
	<i>Fusarium tricinctum</i>					32	16	32	64						
ST8C	<i>Arthrobacter spp</i>	1,0				256	128	> 256	> 256						
ST9C	<i>Fusarium acuminatum</i>		32,6							5	85	0	64	16	36
	<i>Fusarium tricinctum</i>					16	16	> 256	64						
ST10C	<i>Arthrimum spp</i>		51,9			> 256	> 256	> 256	32	0	95	0	91	16	93
ST11C	<i>Fusarium tricinctum</i>		92,9	13,2	18,4					0	78	25	93	18	31
	<i>Fusarium avenaceum</i>					<8	64	> 256	> 256						
ST12C	<i>Penicillium spp</i>		96,0	2,7	0	> 256	> 256	256	> 256	6	6	5	13	0	0
ST13C	<i>Beauveria bassiana</i>		69,7	1,3	0	> 256	> 256	> 256	> 256	0	5	9	21	0	18
ST14C	<i>Pseudomonas spp</i>														
ST15C	<i>Mucor hiemalis</i>	2,0				> 256	> 256	> 256	> 256	0	11	0	0	21	22
ST16C	<i>Pantoea agglomerans</i>	1,0				16	>256	> 256	256	13	11	0	7	0	8
ST17C	<i>Penicillium spp</i>		84,5	0	0	> 256	> 256	> 256	256	1	4	0	0	24	28
ST18C	<i>Fusarium acuminatum</i>		49,0							0	94	0	80	29	94
	<i>Fusarium tricinctum</i>					32	32	32	64						
ST19C	<i>Beauveria bassiana</i>		16,7				>256			5	28	0	21	14	39
	<i>Beauveria pseudobassiana</i>					> 256		16							
ST20C	<i>Pseudomonas spp</i>														
ST21C	<i>Penicillium spp</i>		95,7			> 256	> 256		256	0	3	0	4	18	26
CLL10030	<i>Cordyceps militaris</i>	0				256	> 256	<8	<8	55	0	8	4	78	22
CLL10038	<i>Isaria farinosa</i>		2,0			32	32	64	32	44	0	0	5	72	0
CLL14065	<i>Trichoderma spirale</i>		42,3			>256	> 256	64	32	37	11	0	5	76	0
CLL14069	<i>Beauveria bassiana</i>		20,8			>256				48	20	0	10	79	10
	<i>Beauveria pseudobassiana</i>						> 256	64	> 256						
CLL14070	<i>Ophiocordyceps sp</i>		4,1			>256	> 256	128	> 256	43	35	1	17	88	47

CLL14071	<i>Torrubiella</i>	0	> 256	> 256	> 256	63	33	6	8	78	35
1608C	<i>Ophiocordyceps ditmari</i>	0	> 256	> 256	> 256	38	12	5	12	33	44
1643C	<i>Ophiocordyceps ditmari</i>		> 256	> 256	> 256	41	3	0	16	29	42

Contrôles positifs : fluconazole : CMI = 4 µg/mL contre *C. albicans* et *T. rubrum* ; oxacilline : CMI = 0,5 µg/mL contre *S. aureus* ; vancomycine : CMI = 0,5 µg/mL contre SARM.

Les activités importantes sont marquées en gras.

n. d. non déterminé

Le criblage biologique des extraits issus des 57 souches de micro-organismes a permis de mettre en évidence l'activité larvicide de 10 extraits (taux de mortalité supérieur à 70 %) et l'activité antimicrobienne de 18 extraits ($CMI \leq 32 \mu\text{g/mL}$ sur au moins un des pathogènes). Des activités cytotoxiques ont aussi été observées pour plusieurs extraits. Étonnamment nous avons remarqué que plusieurs extraits présentaient une cytotoxicité plus élevée à $1 \mu\text{g/mL}$ plutôt qu'à $10 \mu\text{g/mL}$ sur les lignées KB et MRC5. Pour l'ensemble il s'agit de champignons appartenant à l'ordre des Hypocréales.

Dans l'ensemble les extraits présentant une activité larvicide n'étaient pas les mêmes que ceux présentant une activité antimicrobienne. Seuls 4 extraits présentaient les deux activités à la fois. Cela laisse présager que les souches actives produisent des métabolites spécifiques pour chaque cible.

Nous avons également constaté que l'activité des extraits n'était pas due à leur cytotoxicité car seule l'extrait SNB-ST11C présente une activité larvicide, antibactérienne sur *S. aureus* et une cytotoxicité importante sur les lignées cellulaires KB et MDA 231.

En ce qui concerne les essais sur moustiques adultes, nous avons voulu évaluer si l'activité observée sur les larves pouvait se retrouver lors des essais par contact sur adultes. Les résultats ont montré qu'aucun des extraits larvicides n'étaient toxique sur adultes. Pour certains extraits, des taux de mortalité supérieur ont été observés à 24h plutôt que 48h, ce qui pourrait s'expliquer par un potentiel effet Knock-Down (KD) des extraits. Ainsi lors de la mise en contact avec l'extrait les moustiques seraient seulement « assommés » et se « réveilleraient » par la suite. Du fait des activités observées, une hypothèse se pose quant à la toxicité des extraits qui agiraient par ingestion sur les larves plutôt que par contact. Cette hypothèse reste néanmoins à nuancer car les mécanismes de défenses et de détoxification chez les larves et les spécimens adultes sont probablement différents et pourraient expliquer la sensibilité des uns par rapport aux autres.

La seconde série d'essais biologiques menée sur les moustiques avait pour but d'observer si les extraits pouvaient avoir un effet irritant en dépit de leur non-toxicité. À l'issue des tests nous n'avons pas mis en évidence d'effet irritant significatif sur les adultes.

A la suite de ce criblage nous avons sélectionné plusieurs extraits afin d'étudier de manière plus approfondie les métabolites secondaires produits par chacune des souches. La sélection des souches s'est faite en tenant compte de plusieurs critères :

- une activité larvicide supérieure ou égale à 75% de mortalité à 24h
- une CMI inférieure ou égale à 32 µg/mL
- espèce peu ou pas étudiée chimiquement afin d'optimiser les possibilités d'obtenir des molécules nouvelles et originales

Les micro-organismes sélectionnés sont les suivants :

- * *Mucor spp.*, deux souches présentant des caractères morphologiques et dont les extraits montraient des activités différentes ont été sélectionnées SNB-VECD11D et SNB-VECD13A

L'extrait de la souche SNB-VECD11D présentait une activité larvicide de 77 % de mortalité à 100 ppm et une activité antibactérienne sur les souches de *Staphylococcus*. Quant à l'extrait AcOEt de la souche SNB-VECD13A, il présentait une activité larvicide de 80 % à 100 ppm.

- * *Isaria farinosa* SNB-CLL10038

Cette dernière a été sélectionnée pour l'activité antimicrobienne de son extrait avec des CMI de 32, 64 et 32 µg/mL respectivement sur SARM, *C. albicans* et *T. rubrum*.

- * *Pantoea spp.* SNB-VECD14B

L'extrait de cette souche bactérienne présentait une activité larvicide (97 % de mortalité à 100 ppm) et une CMI de 16 µg/mL sur *T. rubrum*.

- * *Pestalotiopsis theae* SNB-VECD14E

Son extrait présentait une activité larvicide de 88 % à 100 ppm.

- * *Asaia sp.* SNB-VECD15A

Cette seconde bactérie a été sélectionnée pour l'activité larvicide de son extrait (75 % de mortalité à 100 ppm).

A l'issu de l'identification génétique et du criblage biologique, nous avons observé si des tendances apparaissaient entre la phylogénie, les activités biologiques et l'insecte hôte à partir desquels les souches ont été isolées (**Figure 39** et **Figure 40**).

L'analyse des données a montré que les souches présentant des activités biologiques étaient réparties au sein de différents ordres. Aucune corrélation n'est donc observable entre activité biologique et ordre d'appartenance des souches, bactériennes ou fongiques. On note cependant que de nombreuses souches fongiques appartenant à l'ordre des Eurotiales présentent une activité antimicrobienne et /ou insecticide (**Figure 39**).

De plus, nous n'avons pas observé de réel caractère hôte spécifique des souches. De manière générale nous observons sur un même insecte des micro-organismes appartenant à différents ordres. Toutefois les champignons appartenant à l'ordre des Hypocreales (ici principalement des champignons du genre *Beauveria bassiana*) ont principalement été isolés des coléoptères *Hipodamia undecimnotata* et *Diabrotica speciosa* bien que ces champignons soient connus pour infecter une vaste gamme d'insectes sans réel spécificité (**Figure 39**).²⁰⁷

S'agissant des bactéries, elles ont principalement été isolées des coccinelles du genre *Hipodamia* et d'insectes de la famille des Diaspididae (**Figure 40**). Les bactéries appartenant à l'ordre des Pseudomonadales proviennent aussi exclusivement des coccinelles (*Hipodamia undecimnotata*).

Légende :

Activité biologique	Insectes hôtes
● Extrait larvicide	■ <i>Diabrotica speciosa</i>
● Extrait antimicrobien	■ <i>Hippodamia undecimnotata</i>
	■ <i>Acalymma bivittula</i>
	■ Sternorhyncha, Homoptera
	■ Diaspididae
	■ Vespidae, Hymenoptera
	■ <i>Thaumetopoea pityocampa</i>
	■ Insectes non identifiés

²⁰⁷ Devi KU, Padmavathi J, et al. A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Biocont Sci Tech.* 2008; 18:975–989.

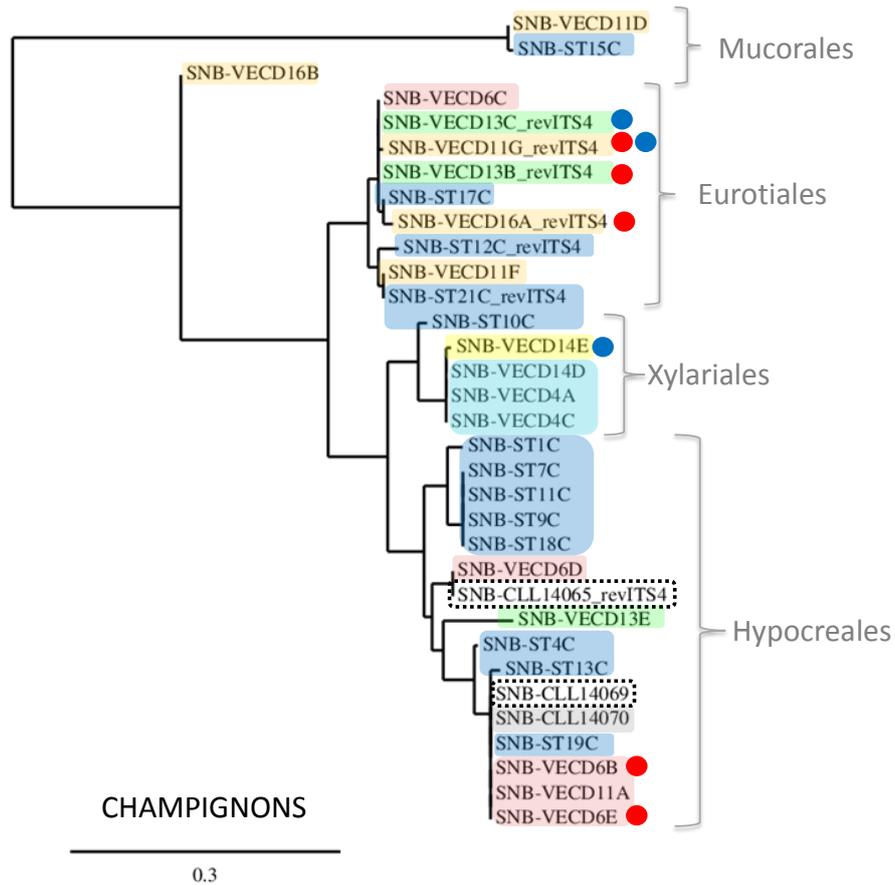


Figure 39 : Arbre phylogénétique de l'ensemble des champignons isolés

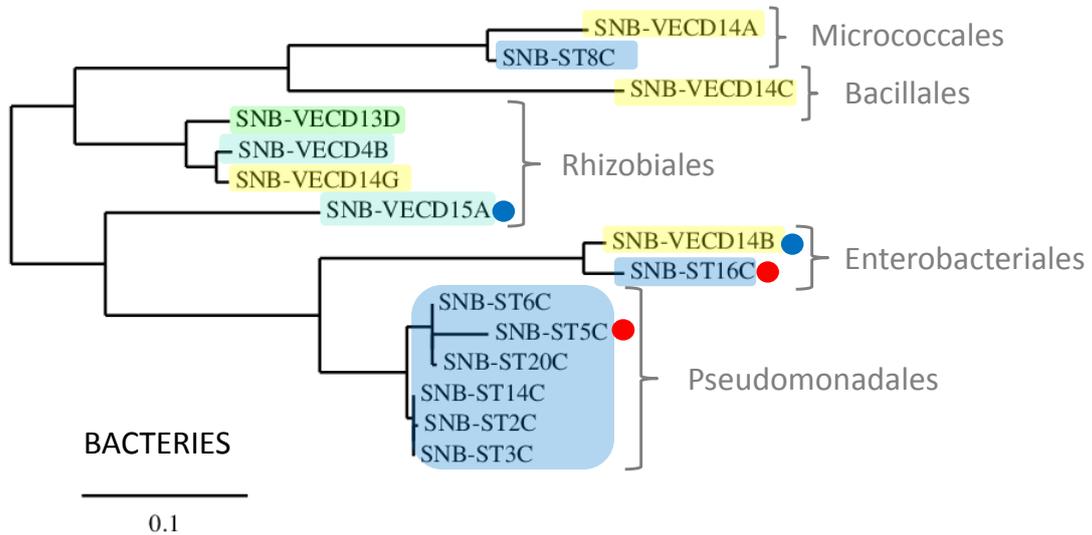


Figure 40: Arbre phylogénétique de l'ensemble des bactéries isolées

Les chapitres suivants du manuscrit présentent les résultats obtenus lors de l'étude chimique des extraits des souches sélectionnées.

3 Etude chimique des extraits de *Mucor* sp. SNB-VECD11D & SNB-VECD13A

Les champignons du genre *Mucor* spp.

Classification

Règne : Fungi

Division : Zygomycota

Classe : Mucormycotina

Ordre : Mucorales

Famille : Mucoraceae

Genre : *Mucor*



Le genre *Mucor* fait parti de la classe des Zygomycètes et est représenté par environ 3000 espèces largement distribuées dans le sol, les plantes, les végétaux et les fruits en décomposition.²⁰⁸ Leur température optimale de croissance est de 27°C dans un environnement humide. L'ordre des Mucorales comprend des champignons à la croissance et la sporulation rapide.²⁰⁹ Leurs caractéristiques physiologiques et leur capacité à produire des enzymes chitinolytiques en font de bons compétiteurs face aux champignons et autres organismes des sols.²¹⁴ Ce champignon a souvent été isolé lors de recherches de micro-organismes entomopathogènes, sur les cadavres d'insectes²¹⁰ ou dans les sols,²¹¹ les enzymes qu'il produit pourraient jouer un rôle important dans son mode de nutrition saprophyte. Certaines espèces du genre sont également décrites comme endophytes.^{212,213}

Enfin, il est connu pour être responsable de maladies chez l'homme appelé mucormycosis. Il peut être responsable d'infection rhino-cérébrale, pulmonaire, gastro-

²⁰⁸ Morin-Sardin S, Rigalma K, et al. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiol.* 2016; 56: 69–79.

²⁰⁹ Ingold CT. The biology of *Mucor* and its allies. *Stud Biol.* 1978; 88.

²¹⁰ Gunde Cimerman N, Zalar P, et al. Mycoflora of cave cricket *Troglophilus neglectus* cadavers. *Mycopathol.* 1998; 141:111–114.

²¹¹ Tkaczuk C, Krzyczkowski T, et al. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from mid-field woodlots and adjacent small-scale arable fields. *Acta Mycol.* 2013; 57:191–202.

²¹² Akone SH, Daletos G, et al. Unguisin F, a new cyclic peptide from the endophytic fungus *Mucor irregularis*. *Z Naturforsch C.* 2016; 71: 15–19.

²¹³ Shipunov A, Newcombe G, et al. Hidden diversity of endophytic fungi in an invasive plant. *Am J Botany.* 2008; 95:1096–1108.

intestinale, cutanée ou d'infections disséminées chez les individus sensibles ou présentant des troubles sous-jacents.²¹⁴

S'agissant des propriétés biologiques, l'équipe de Konstantopoulo a mis en évidence une activité insecticide de l'extrait méthanolique d'une souche du genre *Mucor* sur *Bactrocera oleae* et *Ceralitis capitata*.²¹⁵

Au cours du projet nous avons sélectionné et étudié deux souches fongiques du genre *Mucor*. La sélection s'est faite en tenant compte de l'activité biologique de chacun des extraits de ces souches que nous avons obtenues, l'un présentant uniquement une activité larvicide, et l'autre montrant des propriétés larvicides mais également antibactériennes sur *S. aureus* et SARM. Il faut de plus noter que ces souches présentaient des caractères morphologiques et des profils métaboliques (réalisés sur UHPLC) différents.

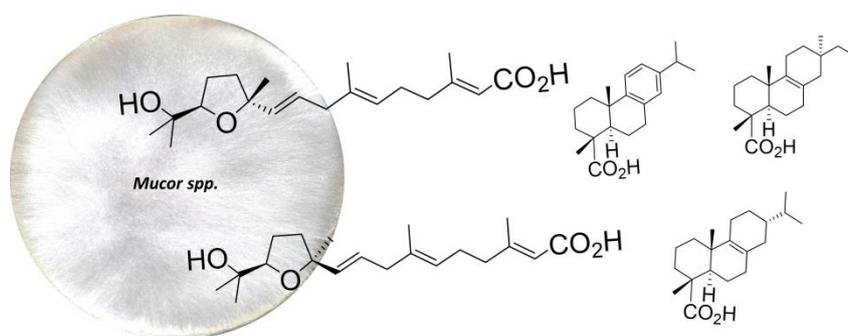
²¹⁴ Richardson M. The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15:2–9.

²¹⁵ Konstantopoulou MA, Milonas P, et al. Partial purification and insecticidal activity of toxic metabolites secreted by a *Mucor hiemalis* strain (SMU-21) against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J Econ Entomol.* 2006; 99:1657–1664.

3.1 Article 1: Two new tetrahydrofuran derivatives from the fungus *Mucor* spp. SNB-VECD11D isolated from the Chrysomelidae *Acalymma bivittula*

Ce premier article publié dans Tetrahedron Letters présente les résultats obtenus suite à l'étude par fractionnement bio-guidé de la souche SNB-VECD11D présentant une activité larvicide de 77% et une CMI de 64 et 16 µg/mL respectivement sur *S. aureus* et SARM lors du criblage initial.

Deux nouveaux dérivés tétrahydrofuraniques sont décrits dans cet article, ainsi que plusieurs acides résiniques présentant des activités antibactériennes.





Two new tetrahydrofuran derivatives from the fungus *Mucor* spp. SNB-VECD11D isolated from the Chrysomelidae *Acalymma bivittula*



Seindé Touré^{a,*}, Isabelle Dusfour^b, Didier Stien^c, Véronique Eparvier^{a,*}

^a CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), Université Paris-Sud, 91198 Gif-sur-Yvette, France

^b Institut Pasteur de la Guyane (IPG), Unité de Contrôle et Adaptation des Vecteurs, 97306 Cayenne, Guyane française, France

^c Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2017

Revised 11 August 2017

Accepted 12 August 2017

Available online 13 August 2017

Keywords:

Mucor spp.

Fungus

Insecticide

Antibacterial

Aedes aegypti

ABSTRACT

Two new tetrahydrofuran derivatives, mucorinic acids A (**1**) and B (**2**) as well as the three known secondary metabolites dehydroabiatic acid (**3**), Δ 8-dihydroabiatic acid (**4**) and 8-pimarenic acid (**5**) were isolated from a solid culture of the fungus *Mucor* spp. isolated on insect *Acalymma bivittula*. The structure of these compounds was elucidated by analysis of NMR and MS spectroscopic data. Compounds were tested in antimicrobial and insecticidal assays. Dehydroabiatic acid exhibited moderate larvicidal activity on *Aedes aegypti* larvae with 65% mortality at 10 ppm. Both new compounds **1** and **2** showed interesting antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *S. aureus* with MIC values in the 8–16 μ g/ml.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The search of insecticidal and antimicrobial molecules represents a global challenge for public health. On one hand, vector-borne diseases account for over 17% of all infectious diseases.¹ In particular, mosquito transmit a number of diseases such as malaria (*Anopheles* sp.), filariasis (*Culex* sp.), dengue and more recently Zika virus (*Aedes* sp.), causing millions of deaths every year.² On the other hand, most antimicrobial drugs suffer from major drawbacks such as emergence of resistant/multiresistant strains and toxicity. Hence, it is critical to discover new, more efficient and safer insecticides and antimicrobials. Entomopathogenic microorganisms are natural enemies of insects. They produce a large diversity of secondary metabolites during the process of infection and proliferation, including insecticides and antimicrobials.³ As such, entomopathogens are considered as an underrated source of novel bioactive compounds of pharmaceuticals and ecological interests.^{4,5}

Based on this dual potential, we have undertaken to search for new insecticides and antimicrobials from a collection of 57 microorganisms isolated from the cuticle of alive, yet infected insect species. All strains were cultivated and extracted with ethyl

acetate. Extracts were screened on human pathogenic microorganisms and on *Aedes aegypti* larvae. The fungus *Mucor* spp. exhibited promising larvicidal and antibacterial properties. *Mucor* fungus belongs to the class of Zygomycota. They were often described as plant pathogens, but can also be deadly pathogens for insects.

Results and discussion

The fungus cultivated on potato dextrose agar and identified as *Mucor* spp. SNB-VECD11D proved very active on *Ae. aegypti* larvae (laboratory reference strain Paea) with mortality rate of 77% after 24 h of exposure at a dose of 100 μ g/ml. It was also active on *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) with minimal inhibitory concentrations (MIC) of 64 μ g/ml and 16 μ g/ml, respectively. The chemical study of *Mucor* spp. extract led to the isolation of two new tetrahydrofurans derivatives **1** and **2**, dehydroabiatic acid⁶ (**3**), Δ 8-dihydroabiatic acid (**4**) and 8-pimarenic acid (**5**) (Fig. 1).

Compound **1** was isolated as pale yellow oil. Its molecular formula was $C_{20}H_{32}O_4$ as determined by HRESITOFMS analysis, which showed a pseudomolecular ion at m/z 337.2394 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{20}H_{33}O_4$, 337.2373), corresponding to five degrees of unsaturation.

The ¹H NMR spectrum of **1** suggested the presence of five methyl groups at δ_H 1.15, 1.16, 1.29, 1.61 and 2.07, and five methines corresponding to δ_H 5.68, 5.62, 5.60, 5.17 and 3.84 (Table 1).

* Corresponding authors.

E-mail addresses: seinde.toure@cnrs.fr (S. Touré), veronique.eparvier@cnrs.fr (V. Eparvier).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.08.031>

0040-4039/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

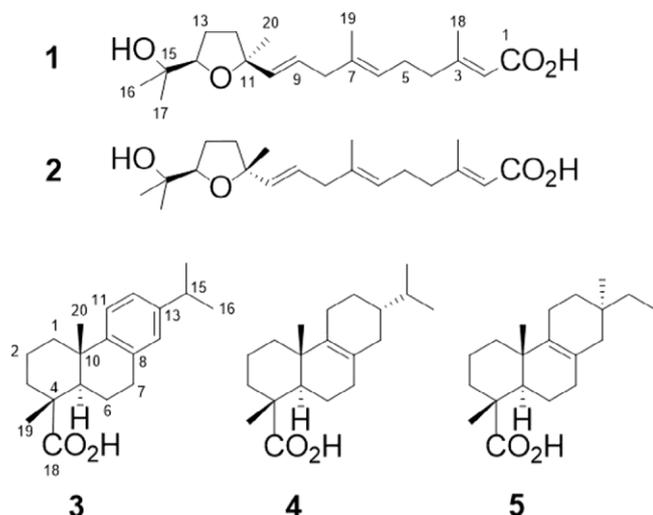


Fig. 1. Structure of compounds 1–5.

The ^{13}C , HSQC and HMBC NMR data allowed the identification of five quaternary carbons at δ_{C} 173.6, 154.5, 135.7, 84.0 and 72.5. Three double bonds and a carbonyl group were detected in HSQC. These accounted for four out of the five unsaturations. The sequence of ^1H – ^1H COSY correlations H-10/ H-9/H-8/H-7/H-6/H-5 and H-4/H-3/H-2 combined with the HMBC correlations H-10/ C-8, C-9; H-8/C-7, C-9 and C-10; H-6/C-4 and C-5; H-4/C-2 and C-3 established a farnesyl-like polyene side chain from C-10 to C-2. Methyl substituents 18 and 19 were connected to C-3 and C-7, respectively. HMBC correlations of protons H-18 to C-1 placed the carboxylic group at the end of the chain (Fig. 2). The *E* configuration of the double bonds can be established based on NOESY correlations H-8/H-6, H-10 and H-2/H-4 (Fig. 3). The tetrahydrofuran moiety was determined based on COSY correlations between H-12 (δ_{H} 1.84/1.94), H-13 (δ_{H} 1.78/1.87) and H-14 (δ_{H} 3.84) combined with HMBC correlations of protons H-12 to C-11 (δ_{C} 84.0), C-13 (δ_{C} 39.0) and C-14 (δ_{C} 86.5). The farnesyl side chain was

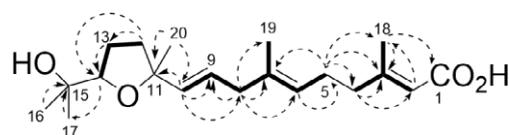


Fig. 2. Key ^1H – ^1H COSY (bold line) and HMBC (dashed arrows) correlations of 1.

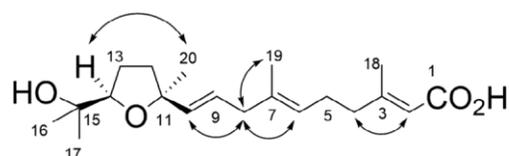


Fig. 3. Key NOESY correlations of 1.

linked to the tetrahydrofuran in C-11 as established by the correlation H-10/C-11. The correlation between methyl groups 16 (δ_{H} 1.15) and 17 (δ_{H} 1.16) with C-14 and C-15 defined a 2-hydroxypropan-2-yl subunit linked to C-14.

The molecular formula and the chemical shifts in C-11 (δ_{C} 84.0) and C-14 (δ_{C} 86.5) suggested these two carbons were linked by oxygen therefore forming a tetrahydrofuran ring. This was confirmed by a NOE correlation between H-14 and H-20, also indicating that H-14 and methyl 20 are on the same side of the ring (Fig. 3). Overall compound 1 was the (2*E*,6*E*,9*E*)-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyltetrahydrofuran-2-yl)-3,7-dimethyldeca-2,6,9-trienoic acid and was named mucoricinic acid A.

Compound 2 was obtained as pale yellow oil. Its molecular formula was determined as $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4$ based on HRESITOFMS experiment (m/z 337.2348 $[\text{M}+\text{H}]^+$). This compound has five degrees of unsaturation and the ^1H , ^{13}C and HSQC NMR data revealed that it was an analogue of compound 1. The main difference was observed in the ROESY analysis. In compound 2, H-9 and H-10 correlate with H-14 therefore confirming the relative configuration proposed in Fig. 1. This compound was named mucoricinic acid B.

Isolated compounds from *Mucor* spp. strain were evaluated for their antimicrobial activities against several human pathogens and

Table 1
NMR Spectroscopic Data (CD_3OD) for compounds 1 and 2.

Pos.	1		2	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$, type	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$, type	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$ (J in Hz)
1	173.6, C		173.0, C	
2	120.74, CH	5.68, m	119.7, CH	5.68, m
3	154.5, C		156.4, C	
4	41.44 CH_2	2.14, m	41.5, CH_2	2.15, m
5	27.1, CH_2	2.20, m	27.1, CH_2	2.21, m
6	125.3, CH	5.17, t (6.9)	125.1, CH	5.17, t (6.9)
7	135.7, C		135.8, C	
8	43.5, CH_2	2.68, d (6.5)	43.3, CH_2	2.68, d (6.3)
9	126.8, CH	5.60, m	126.6, CH	5.56, m
10	138.8, CH	5.62, m	138.1, CH	5.51, m
11	84.0, C		84.1, C	
12	27.6, CH_2	a: 1.84, m b: 1.94, m	27.4, CH_2	a: 1.84, m b: 1.88, m
13	39.0, CH_2	a: 1.78, m b: 1.87, m	38.4, CH_2	a: 1.67, m b: 1.86, m
14	86.5, CH	3.84, m	86.6, CH	3.78, m
15	72.5, C		72.5, C	
16	25.8, CH_3	1.15, br s	25.6, CH_3	1.15, s
17	25.8, CH_3	1.16, br s	25.7, CH_3	1.16, s
18	18.5, CH_3	2.07, s	18.6, CH_3	2.09, s
19	16.0, CH_3	1.61, s	16.0, CH_3	1.61, s
20	26.3, CH_3	1.29, s	27.4, CH_3	1.30, s

^a Data recorded at 150 MHz.

^b Data recorded at 600 MHz.

^c Carbon shift were obtained based on HSQC and HMBC data.

Table 2
Antimicrobial and larvicidal activity (at 10 ppm) of compounds **1–5**.

Compound	Larvicidal activity (% mortality)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>T. rubrum</i>
1	2.0	>256	16	16	>256
2	2.1	>256	8	16	>256
3	65.0	>256	128	64	64
4	6.2	>256	16	16	>256
5	10.0	>256	16	16	>256
Pos. Ctrl. ^a		4	0.2	0.6	4

^a Positive control: oxacillin for *S. aureus*; fluconazole for *C. albicans* and *T. rubrum*; vancomycin for MRSA.

for their larvicidal activities against *Ae. aegypti* larvae. Dehydroabi-
etic acid (**3**) exhibited larvicidal activity on *Ae. aegypti* whereas the
other four compounds exhibited moderate antimicrobial activity
but no antifungal activity (Table 2).

In conclusion this letter reports the first description of two new
antibacterial tetrahydrofuran derivatives mucorinic acids A and B.
The same fungus also produces abietane or pimarane diterpenoids
3–5. Compound **3** known as a conifer biomarker has been discov-
ered later from fungi and cyanobacteria.^{7,8} *Mucor* spp. SNB-
VECD11D is another fungus able to produce abietanes and
pimaranes.

Acknowledgements

This research was part of the Laboratory of Excellence «Centre
d'étude de la Biodiversité Amazonienne» (Labex CEBA, (CEBA, ref.
ANR-10-LABX-25-01). The authors are very grateful to C. Gourmel
(BioSavane association) for collecting the infected insects and
C. Duplais to transfer the biological material included in Funchem,
the collaborative project of CEBA Labex.

A. Supplementary data

Supplementary data (NMR data of compounds **1, 2, 3, 4** and **5** as
well as MS data of **1** and **2**) associated with this article can be
found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.08.031>.

References

- WHO. Media center. Vector borne diseases <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/> (accessed October 2016).
- Rahuman AA, Bagavan A, Kamaraj C, Saravanan E, Zahir AA, Elango G. *Parasitol Res.* 2009;104:1365–1372.
- Jan Scholte E, Knols BG, Samson RA, Takken WJ. *Insect Sci.* 2004;4:1–24.
- (a) Azumi M, Ishidoh K, Kinoshita H, et al. *J Nat Prod.* 2000;71:278–280;
(b) Lee SY, Kinoshita H, Ihara F, Igarashi Y, Nihira T. *J Biosci Bioeng.* 2008;105:476–480.
- Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, et al. *Fungal Ecol.* 2009;2:149–159.
- Costa MS, Rego A, Ramos V, et al. *Sci Rep.* 2016;21:6–23436.
- Torres A, Dor I, Rotem J, Srebnik, Dembitsky VM. *Eur J Biochem.* 2003;270:2120–2125.
- Ayer WA, Macaulay JB. *Can J Chem.* 1987;65:7–14.

SUPPORTING INFORMATION FOR :

Two new tetrahydrofuran derivatives from the fungus *Mucor* spp. SNB-VECD11D isolated from the Chrysomelidae *Acalymma bivittula*

Seindé Touré ^{a*}, Isabelle Dusfour ^b, Didier Stien ^c, Véronique Eparvier ^{a*}

^a CNRS, Universités Paris-Sud, Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), 1 avenue de la terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

^b Institut Pasteur de la Guyane (IPG), Unité de Contrôle et Adaptation des Vecteurs, 23 Avenue Pasteur, BP 6010, 97306 Cayenne, France

^c Sorbonnes Universités, UPMC Univ Paris 6, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire océanologique, 66650 Banyuls-sur-mer, France

*Corresponding authors.

Tel : +33 1 69 82 36 65; E-mail: seinde.toure@cnrs.fr (S. Touré)

Tel : +33 1 69 82 36 79; E-mail: veronique.eparvier@cnrs.fr (V. Eparvier)

Table of contents

Experimental

Table S1. Full NMR spectroscopic data for compound **1**

Figure S1. ¹H NMR spectrum for compound **1** in CD₃OD

Figure S2. COSY spectrum for compound **1** in CD₃OD

Figure S3. HSQC spectrum for compound **1** in CD₃OD

Figure S4. HMBC spectrum for compound **1** in CD₃OD

Figure S5. NOESY spectrum for compound **1** in CD₃OD

Figure S6. ROESY spectrum for compound **1** in CD₃OD

Figure S7. Mass spectrum for compound **1**

Table S2. Full NMR spectroscopic data for compound **2**

Figure S8. ¹H NMR spectrum for compound **2** in CD₃OD

Figure S9. ¹³C NMR spectrum for compound **2** in CD₃OD

Figure S10. COSY spectrum for compound **2** in CD₃OD

Figure S11. HSQC spectrum for compound **2** in CD₃OD

Figure S12. HMBC spectrum for compound **2** in CD₃OD

Figure S13. NOESY spectrum for compound **2** in CD₃OD

Figure S14. ROESY spectrum for compound **2** in CD₃OD

Figure S15. Mass spectrum for compound **2**

Figure S16. ¹H NMR spectrum for compound **3** in CD₃OD

Figure S17. ¹³C NMR spectrum for compound **3** in CD₃OD

Table S3. Full spectral data for compound **4**

Figure S18. ¹H NMR spectrum for compound **4** in CD₃OD

Figure S19. ¹³C NMR spectrum for compound **4** in CD₃OD

Table S4. Full spectral data for compound **5**

Figure S20. ¹H NMR spectrum of compound **5** in CD₃OD

Figure S21. ¹³C NMR spectrum of compound **5** in CD₃OD

Experimental

General experimental procedures. Optical rotations were obtained on an Anton Paar MCP 200 polarimeter in a 100 mm-long 350 μ L cell using MeOH as a solvent at 20°C. High resolution- ESITOFMS measurements were performed using a Waters Acquity UHPLC system coupled to Waters Micromass LCT-Premier Time-of-Flight mass spectrometer equipped with an electrospray interface (ESI). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) data were recorded in CD₃OD on a Bruker 500 MHz spectrometer or on a Bruker 600 MHz spectrometer equipped with a 1mm inverse detection probe. Chemical shift (δ) are reported in ppm based on TMS signal and coupling constant (J) are reported in Hertz. Flash chromatography was performed on a Grace Reveleris system with UV and ELSD detectors equipped with an 120 g C₁₈ column or an 80 g silica column. HPLCs were conducted on a Gilson system equipped with a 322 pumping device, a GX-271 fraction collector, a 171 diode array detector and a prepELSII detector electrospray nebulizer. Columns used in analytical analysis included a Phenomenex Luna C₁₈ (5 μ m, 4.6 x 250 mm) and a Phenomenex Kinetex C₈ (5 μ m, 4.6 x 250 mm). Columns used in preparative analysis included a Phenomenex Luna C₁₈ (5 μ m, 21.2 x 250 mm) and Kinetex C₈ (5 μ m, 21.2 x 250 mm) columns.

Collection and Identification of *Mucor* spp. SNB-VECD11D. An individual of the insect species *Acalymma bivittula* infected by entomopathogenic microorganisms was collected in Montsinéry, French Guiana. The cuticle of the insect was scraped with a handle and transplanted on a Petri dish containing a solid Potato Dextrose Agar (PDA) medium and then stored at 28 °C. After one day, growing fungi hyphae were removed and transferred into another Petri dish. The strain SNB-VECD11D was saved in triplicate at -80 °C in H₂O – Glycerol (50/50). A sample was submitted for amplification of nuclear ribosomal internal transcribed spacer region ITS1 which allowed identification by comparison with NCBI sequence. The sequence was registered in the NCBI Genbank database with the accession number **KX858863** and identified as *Mucor* spp. Molecular analysis was performed externally by BACTUP, France.

Culture, Extraction and Isolation. The fungal strain was cultivated on Petri dishes of PDA solid medium initially on a small scale then on 450 14-cm Petri Dishes at 28 °C during 15 days. The culture medium containing the mycelium was cut into small pieces and macerated with ethyl acetate (EtOAc) at room temperature on a rotary shaker (70 rpm) during 48h. The content was extracted three times with EtOAc (3 x 5 L) in a separating funnel. The combined organic layers were washed with water. The organic solvent was evaporated to dryness under reduced pressure to yield the crude extract (2.8 g). A part of the crude extract (2.7 g) was fractionated by reverse flash chromatography on C₁₈ column with linear gradient water – acetonitrile (v/v, 1:0 to 0:1 in 20 min, flow rate 80 ml/min) followed by another gradient of acetonitrile - methylene chloride (v/v, 1:1 to 0:1 in 15 min, flow rate 80 ml/min) to generate 10 fractions, from A

to J. The larvicidal and antimicrobial activities concentrated in fractions F (48.7 mg) and G (20.1 mg).

Fraction F was fractionated by preparative HPLC with H₂O – ACN (50:50 to 0:100 in 20 min, flow rate 21 ml/min) to afford compound **1** (0.3 mg, *t_R* 12.75 min) and compound **2** (0.9 mg, *t_R* 13.44 min).

Fraction G afforded dehydroabietic acid **3** (20.1 mg, *t_R* 15.7 min) as a major compound with gradient of H₂O – ACN (30:70 to 0:100 in 20 min).

The two others compounds, Δ 8-dihydroabietic acid (**4**) (1 mg, *t_R* 14.5 min) and 8-pimarenic acid (**5**) (1.5 mg, *t_R* 14 min) were obtained from heptane part of the crude extract after its partition between heptane and methanol / H₂O (50:50). Heptane part was investigated by flash chromatography on a 80 g C18 silica gel with linear gradient heptane-methylene chloride (v/v, 1:1 to 0:1 in 35 min, flow rate 60 ml/min) and generated 9 fractions. The study by prep-HPLC of the fraction 5 with H₂O – ACN (30/70 to 0/100 in 20 min, flow rate 21 ml/min) allowed to isolate these two compounds.

Mucorinic acid A (1) : $[\alpha]^{25}_D$ - 3.00 (c 0.1, MeOH); ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table S1; HRESITOFMS *m/z* 337.2394 [M+H]⁺ (calcd for C₂₀H₃₃O₄, 337.2373).

Mucorinic acid B (2) : $[\alpha]^{25}_D$ + 2.00 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) 208 (3.6); ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table S2; HRESITOFMS *m/z* 337.2348 [M+H]⁺ (calcd for C₂₀H₃₃O₄, 337.2373).

Dehydroabietic acid (3) : $[\alpha]^{25}_D$ + 19.8 (c 0.5, MeOH); ¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz) δ 7.15 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-11), 6.96 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, H-12), 6.85 (1H, s, H-14), 2.85 (2H, m, H-7), 2.79 (1H, sept, *J* = 7.0 Hz, H-15), 2.34 (1H, m, H-1b), 2.16 (1H, dd, *J* = 12.5, 2 Hz, H-5), 1.86 (1H, m, H-6b), 1.83 (1H, m, H-2b), 1.81 (1H, m, H-3b), 1.71 (1H, m, H-2a), 1.67 (1H, m, H-3a), 1.52 (1H, m, H-6a), 1.43 (1H, m, H-1a), 1.26 (3H, s, H-19), 1.21 (3H, s, H-20), 1.20 (3H, d, *J* = 5.2 Hz, H-17), 1.20 (3H, d, *J* = 5.2 Hz, H-16) / ¹³C-NMR (CD₃OD, 125MHz) δ 182.7 (C, C-18), 148.3 (C, C-9), 147.1 (C, C-13), 135.8 (C, C-8), 127.9 (CH, C-14), 125.3 (CH, C-11), 125.1 (CH, C-12), 48.3 (C, C-4), 46.7 (CH, C-5), 39.7 (CH₂, C-1), 38.2 (CH₂, C-3), 38.2 (C, C-10), 35.0 (CH, C-15), 31.3 (CH₂, C-7), 25.7 (CH₃, C-20), 24.6 (CH₃, C-16), 24.6 (CH₃, C-17), 23.0 (CH₂, C-6), 19.8 (CH₂, C-2), 17.1 (CH₃, C-19); HRESITOFMS [M+H]⁺ *m/z* 301.2186 (calcd for C₂₀H₂₉O₂, 301.2162).

Δ -8 dihydroabietic acid (4) : $[\alpha]^{25}_D$ + 167.0 (c 0.1, MeOH); ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table S3; HRESITOFMS *m/z* 305.2485 [M+H]⁺ (calcd for C₂₀H₃₃O₂, 305.2475).

8-pimarenic acid (5) : $[\alpha]^{25}_D$ + 20.0 (c 0.5, MeOH); ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table S4; HRESITOFMS [M+H]⁺ *m/z* 305.2484 (calcd for C₂₀H₃₃O₂, 305.2475).

Evaluation of Larvicidal Activity. Insect Collection and Rearing : *Aedes aegypti* strain was used for testing the extracts and the compounds. The laboratory strain Paea, came

from French Polynesia and has been maintained for a decade at the Institut Pasteur de la Guyane, in French Guiana. This strain is susceptible to all insecticides. *Ae. aegypti* eggs were conserved on dried paper strips. Hatching was produced by dropping these strips in water and placing them under vacuum pressure for at least 1 hour. Larvae were fed with yeast pellets. Larval rearing was performed under natural conditions at 28°C +/- 2°C, 80% +/- 20% RH with a photoperiod 14 :10 h dark and light cycles. Late third or early fourth-instar larvae were used in the tests.

All crude extract and fractions were investigated using the WHO procedure for testing mosquito larvicides.¹ The larvicidal activity of pure compounds was evaluated using a tube assay.

Cup Assay. A total of 100 larvae were exposed in each bioassay. Four replicates of 25 larvae were prepared in cups containing 99 ml of distilled water. An aliquot of 1 ml of extract/fractions at the desired concentration in absolute ethanol was added to each cup. The crude extract and the fractions were both tested at 100 ppm. Negative-control treatment was performed for each test with 1 ml of absolute ethanol. Larval mortality was recorded 24 h after exposure.

Tube Assay. Ten replicates per concentration were prepared, each containing 50 larvae (10 test tubes x 5 larvae). Each compound was tested at 10 µg/ml. A stock solution was prepared at 1 mg/ml in absolute ethanol, then 30 µL was added to each test tube (75x12x0.8-1.0 soda rimless, catalog #212-0013, VWR, International) containing 2.97 ml of distilled water. Larval mortality was recorded at 24 h after exposure.

Statistical Analysis. Abbott's formula was applied to mortalities if mortality in control was between 5 and 20%. The test was invalidated if mortality in control was greater than 20%.²

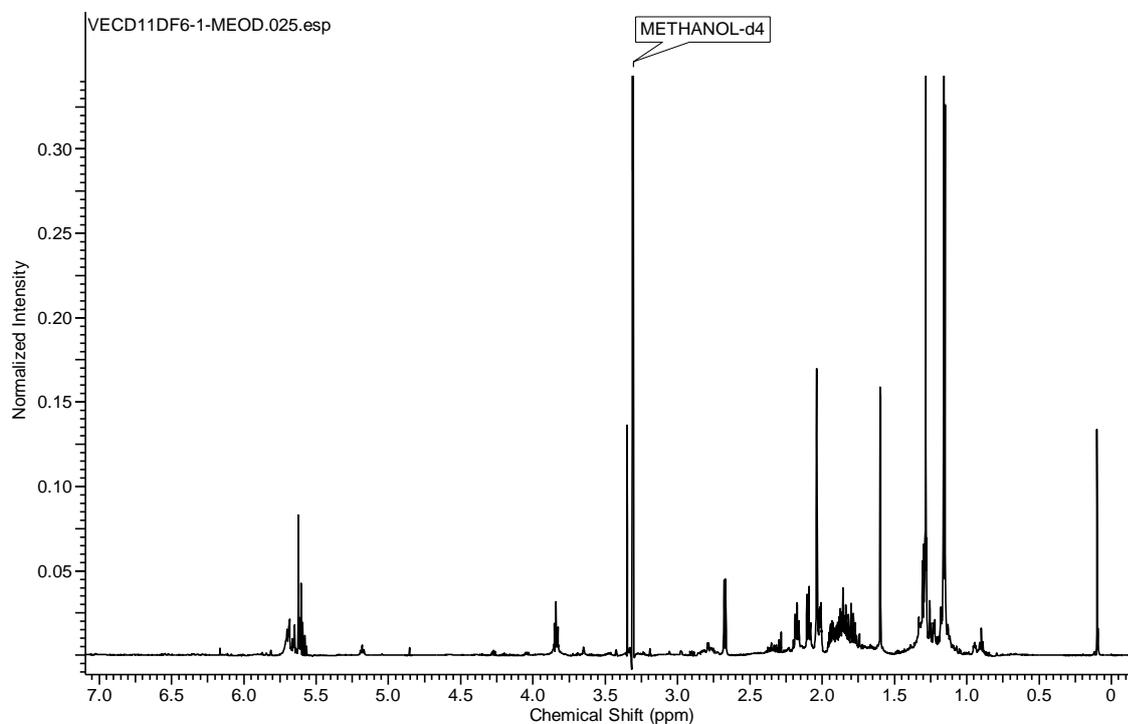
Antimicrobial Assays. The ATCC strains were purchased at Pasteur Institute and clinical isolate provided by Phillippe Loiseau (Univ. Paris Sud). The strains used in this study were : *Candida albicans* ATCC10231, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC33591 and *Trichophyton rubrum* SNB-TR1. Extracts, fractions and pure compounds were tested according to the reference protocol of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.³ The MIC value was obtained after 24h for bacteria, 48h for yeast and 5 days for *T. rubrum*.

Table S1. Full NMR spectroscopic data for compound **1** in CD₃OD

Pos.	$\delta_C^{a,c}$, type	δ_H^b , m (J in Hz)	COSY	HMBC	NOESY	ROESY
1	173.6, C					
2	120.74, CH	5.68, m	18	18	4	
3	154.5, C					
4	41.44 CH ₂	2.14, m		2, 3, 5, 6, 18	2	
5	27.1, CH ₂	2.20, m	6, (8), (19)	(3), 4, 6, 7, (18)		
6	125.3, CH	5.17, t (6.9)	5, (8), (19)	(4), 5, 8, 19	8	8
7	135.7, C					
8	43.5, CH ₂	2.68, d (6.5)	5, 9, (19)	6, 7, 9, 10, 19	6, 10, 19	6, 10, 19
9	126.8, CH	5.60, m	8	4, 10, 11		
10	138.8, CH	5.62, m	8	8, 9, 11	8, 13b	8
11	84.0, CH					
12	27.6, CH ₂	a: 1.84, m b: 1.94, m	14 14, 13b	11, 13, 14, 15 11, 13, 15	14	14
13	39.0, CH ₂	a: 1.78, m b: 1.87, m	12a	10, 11, 12, 14, 17, 20 10, 11, 12, 14, 17, 20	10, 16	17, 20
14	86.5, CH	3.84, m	12, 13	16, 17	12b, 16, 20	12b, 16
15	72.5, C					
16	25.8, CH ₃	1.15, br s		14, 15, 17	13b, 14	14
17	25.8, CH ₃	1.16, br s		14, 15, 16	12b	13b
18	18.5, CH ₃	2.07, s	2	1, 2, 3, 4		
19	16.0, CH ₃	1.61, s	5, 8	6, 7, 8	8	5, 8
20	26.3, CH ₃	1.29, s		10, 11, 13	14	13b

^a Data recorded at 150MHz. ^b Data recorded at 600MHz.

^c Carbon shift were obtained based on HSQC and HMBC data.

**Figure S1.** ¹H NMR spectrum of **1** recorded at 600 MHz in CD₃OD

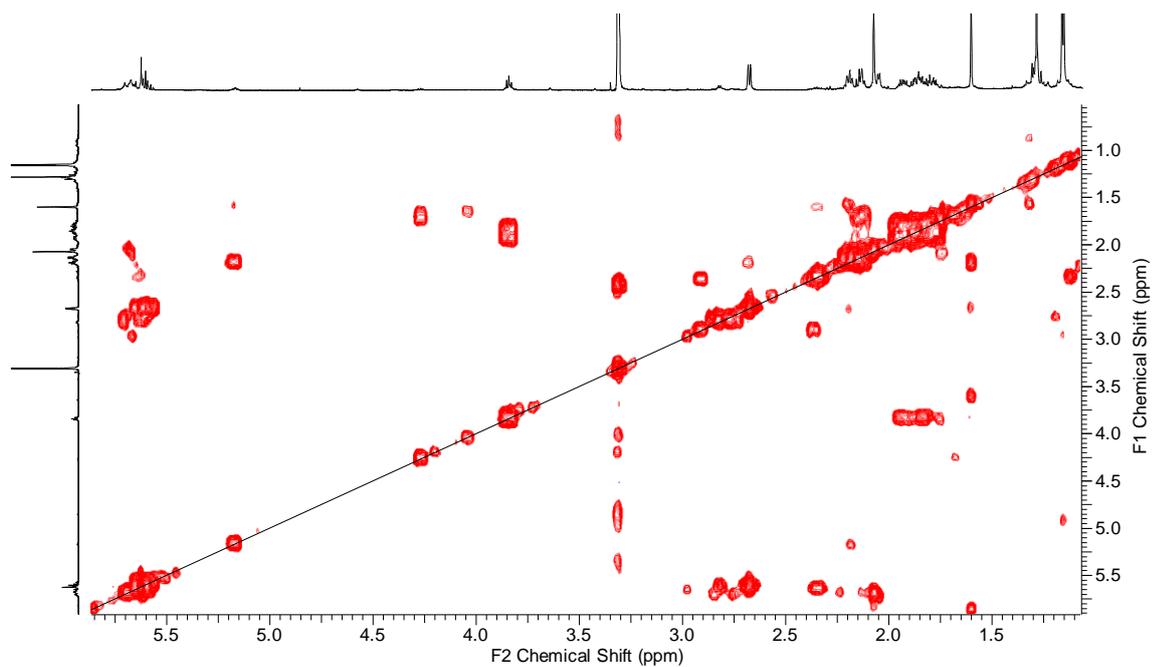


Figure S2. COSY spectrum of **1** recorded at 600 MHz in CD₃OD

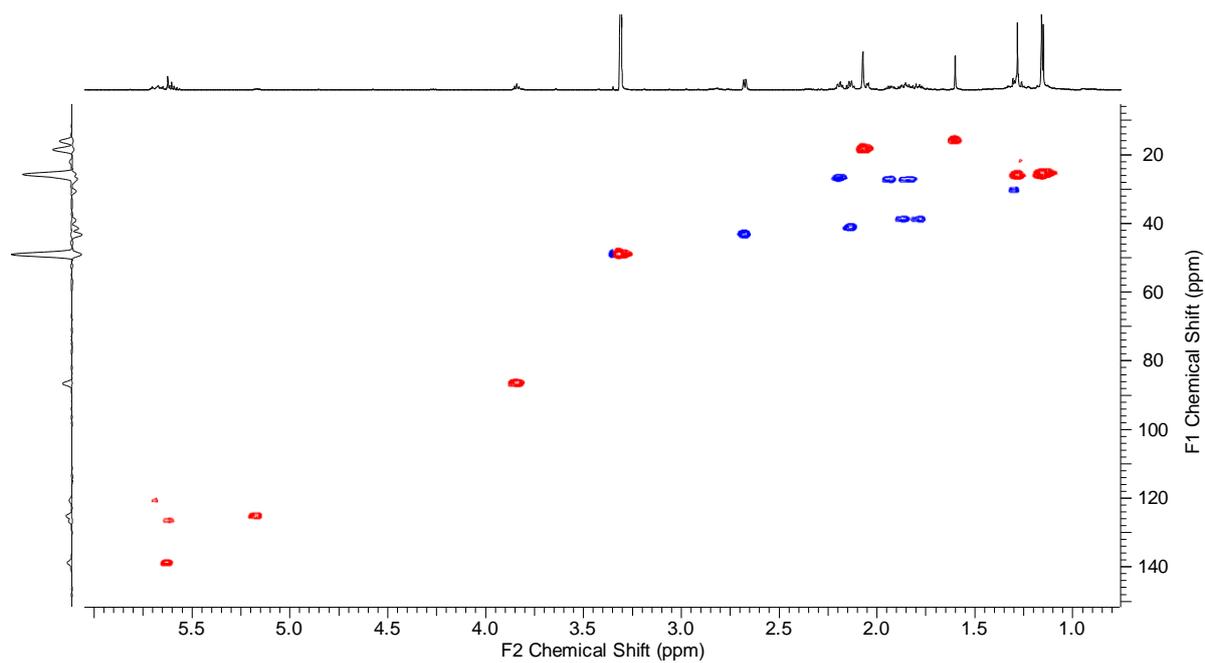


Figure S3. HSQC spectrum of **1** recorded at 600 MHz in CD₃OD

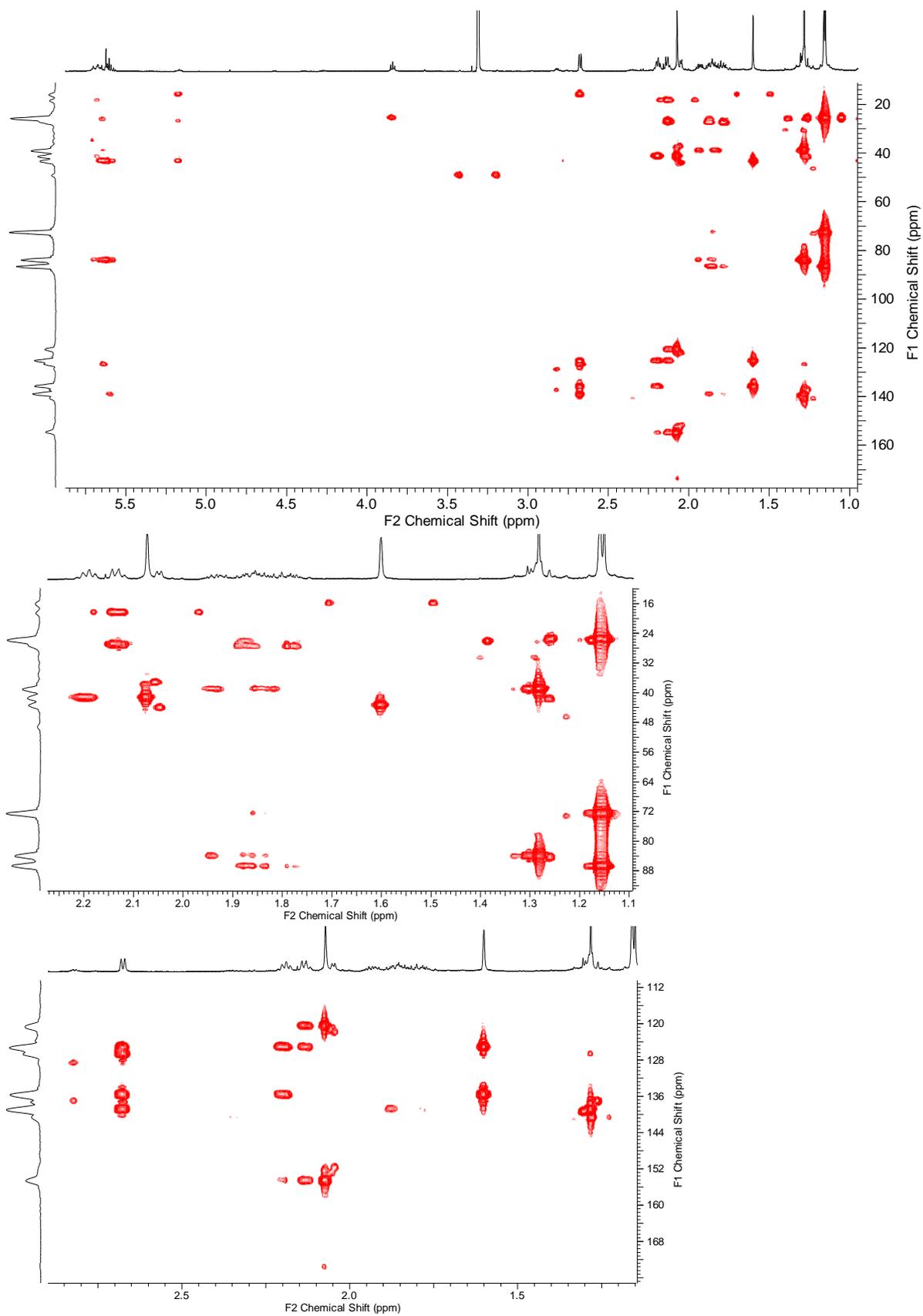


Figure S4. HMBC spectra of **1** recorded at 600 MHz in CD₃OD (with zoom)

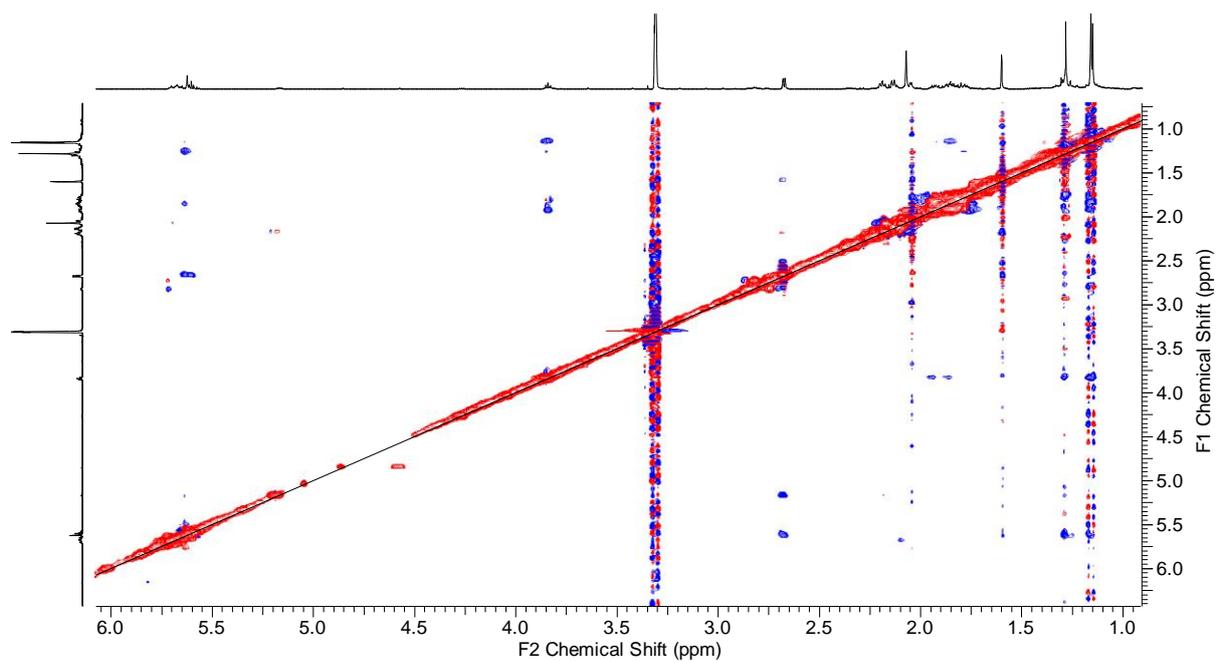


Figure S5. NOESY spectrum of **1** recorded at 600 MHz in CD₃OD

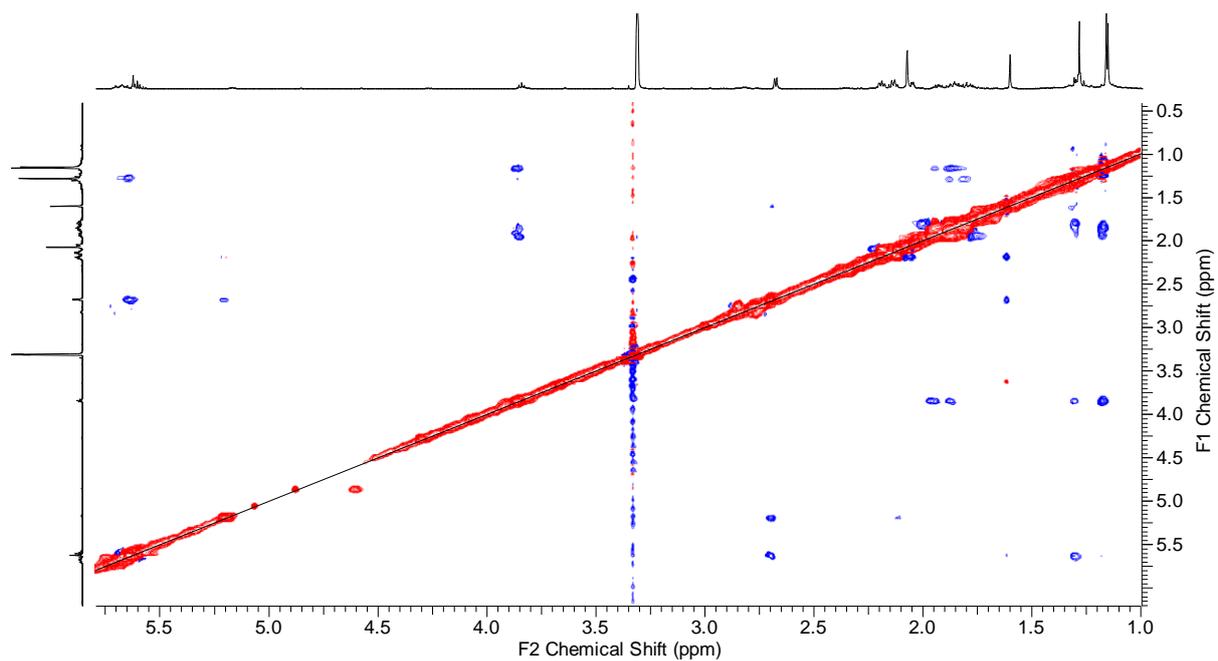


Figure S6. ROESY spectrum of **1** recorded at 600 MHz in CD₃OD

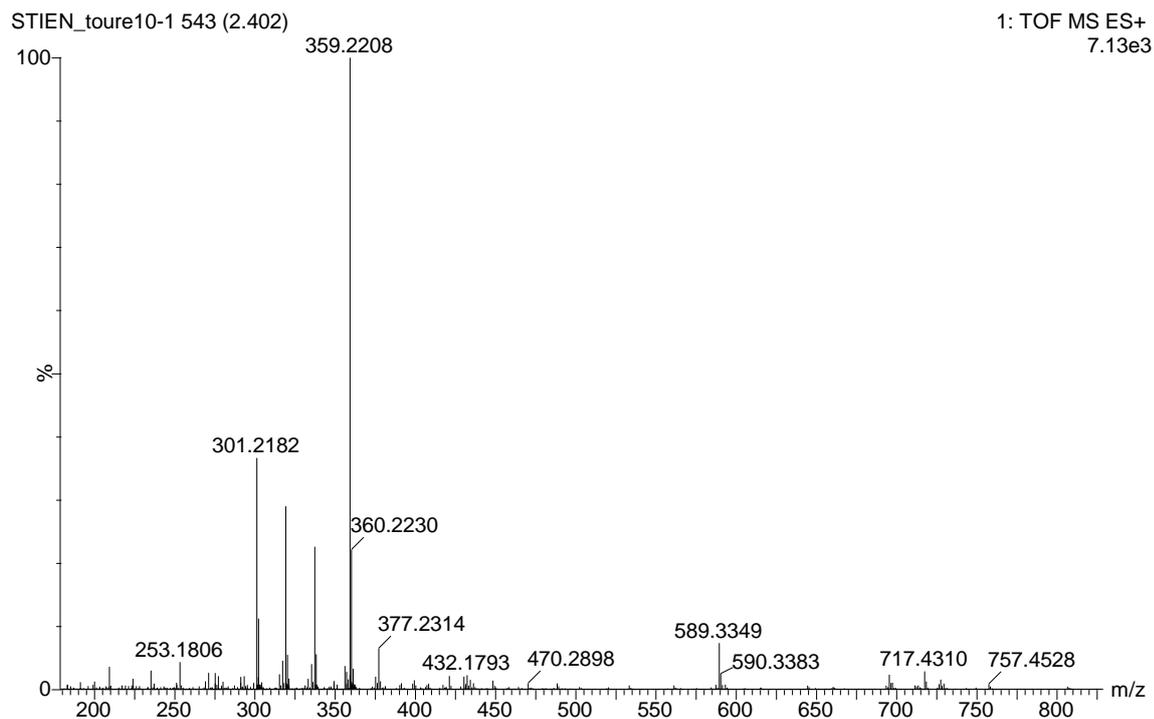


Figure S7. Mass spectrum of compound **1**

Table S2. Full NMR spectroscopic data for compound **2** in CD₃OD

Pos.	δ_C^a , type	δ_H^b , m (J in Hz)	COSY	HMBC	ROESY
1	173.0, C				
2	119.7, CH	5.68, m	4, 18		
3	156.4, C				
4	41.5, CH ₂	2.15, m	2, 6	2, 3, 5, 6, 18	6
5	27.1, CH ₂	2.21, m	4, 19	3, 4, 6, 7	6, 19
6	125.1, CH	5.17, t (6.9)	4, 5, 8, 19	8, 19	4, 5, 8
7	135.8, C				
8	43.3, CH ₂	2.68, d (6.3)	(5), 6, 10, 19	6, 7, 9, 10, 19	6, 9, 10, 19
9	126.6, CH	5.56, m	8	7, 8, 10, 11	8, 14
10	138.1, CH	5.51, m	8	8, 11	8, 14, 20
11	84.1, C				
12	27.4, CH ₂	a: 1.84, m b: 1.88, m		11, 13, 14, 15 10, 15, 20	
13	38.4, CH ₂	a: 1.67, m b: 1.86, m	13a 12b, 13b 13a, 14	10, 11, 14, 20 11, 14, 15	14, 16
14	86.6, C	3.78, m	13b	13, 17	8, 9, 10, 16
15	72.5, C				
16	25.6, CH ₃	1.15, s		14, 15, 17	14
17	25.7, CH ₃	1.16, s		14, 15, 16	
18	18.6, CH ₃	2.09, s	2	2, 3, 4	
19	16.0, CH ₃	1.61, s	5, 6, 8	(4), 6, 7, 8, (9)	5, 8
20	27.4, CH ₃	1.30, s		10, 11, 13	5, 8, 10

^aData recorded at 150MHz. ^bData recorded at 600MHz.

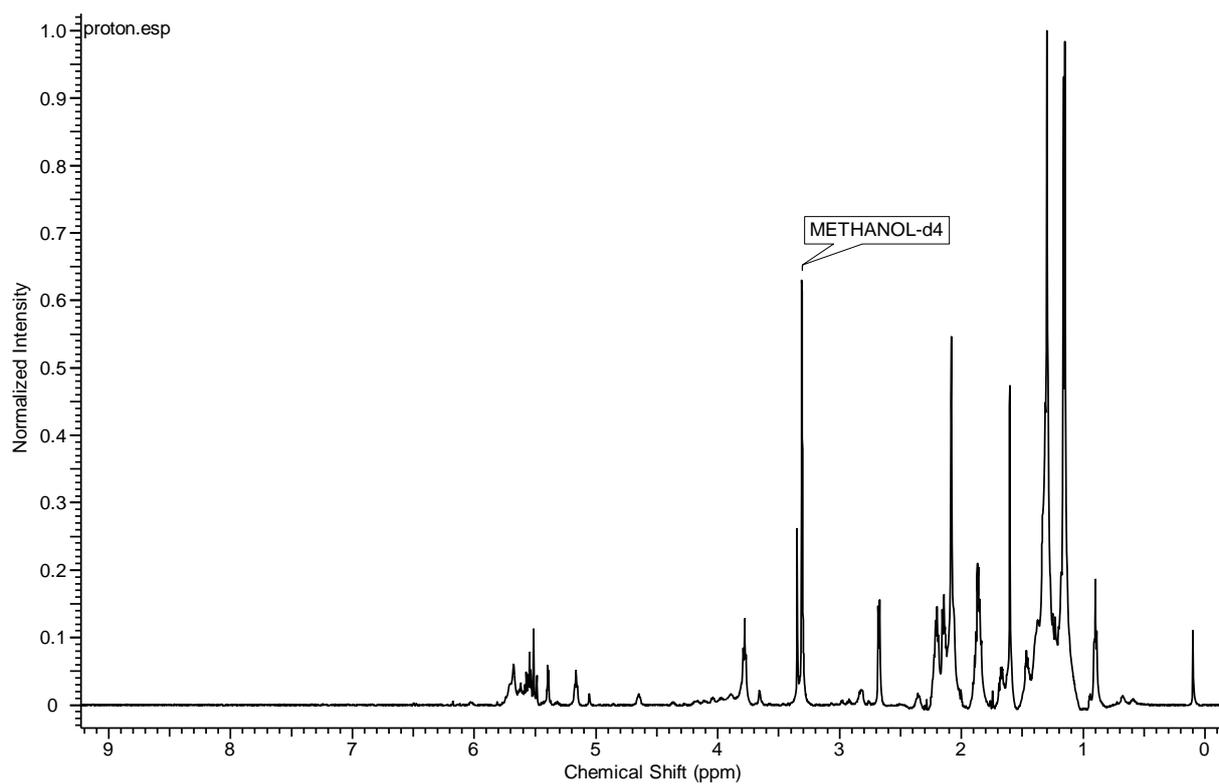


Figure S8. ^1H NMR spectrum of **2** recorded at 600 MHz in CD_3OD

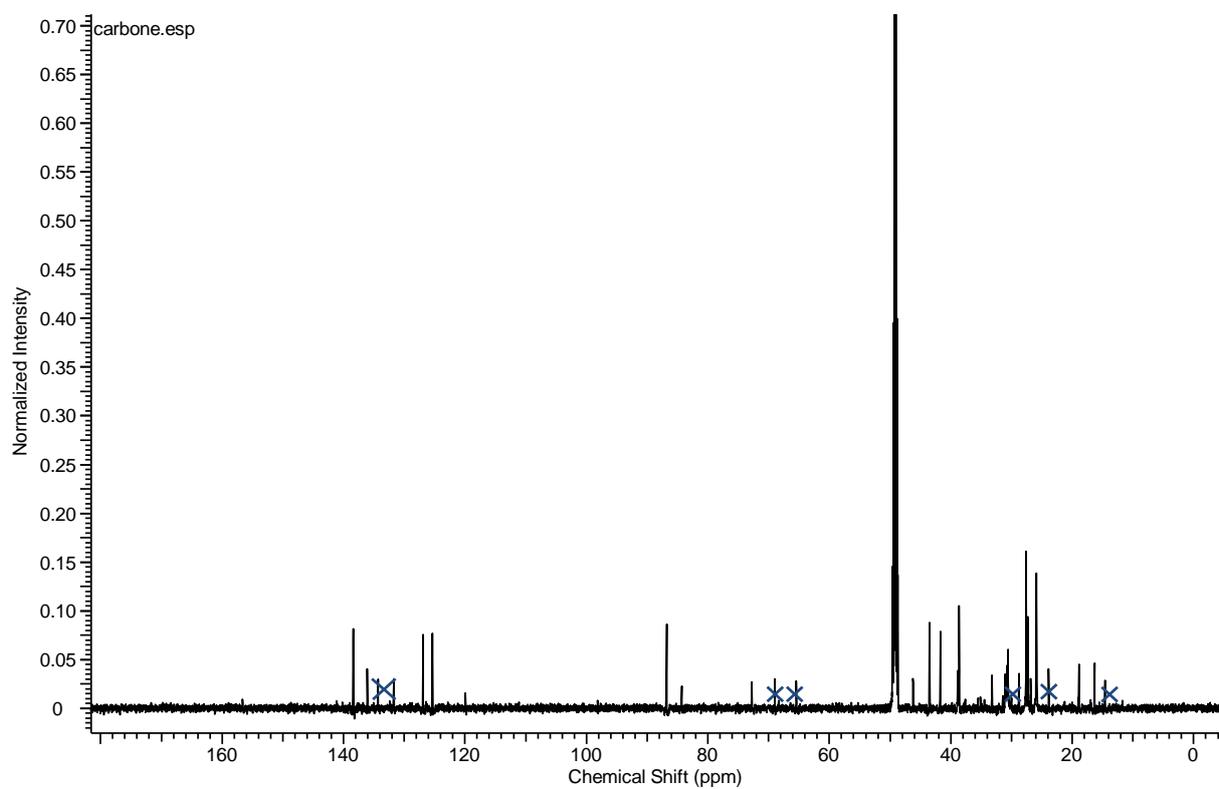


Figure S9. ^{13}C NMR spectrum of **2** recorded at 150 MHz in CD_3OD

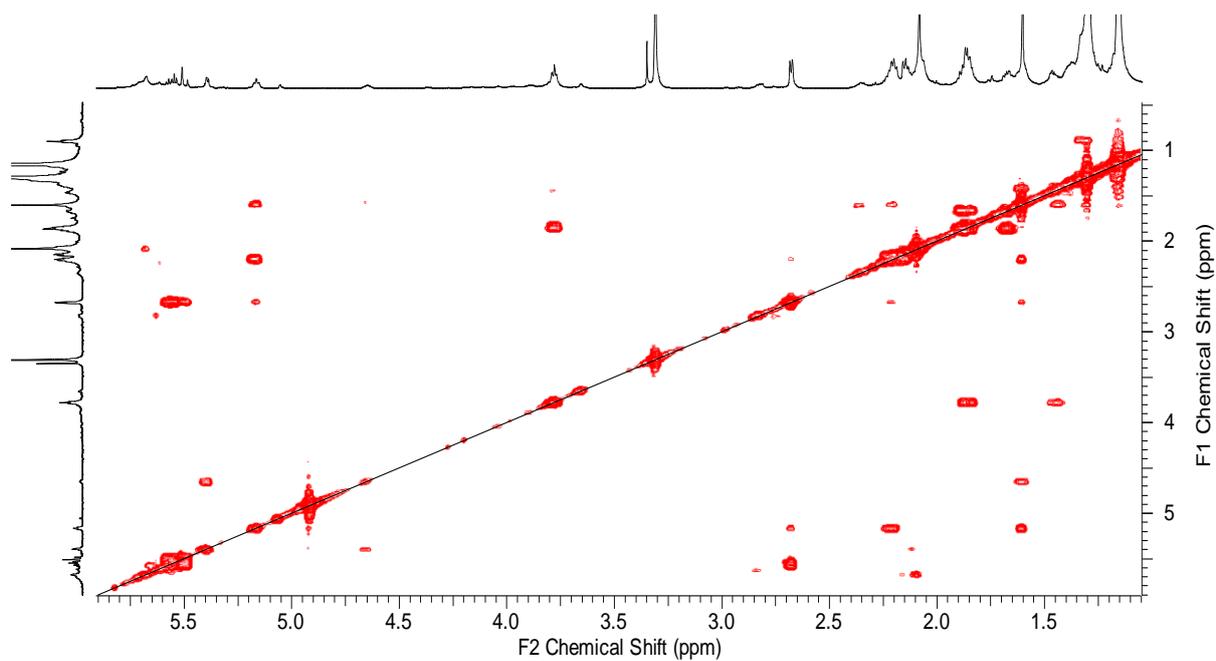


Figure S10. COSY spectrum of **2** recorded at 600 MHz in CD₃OD

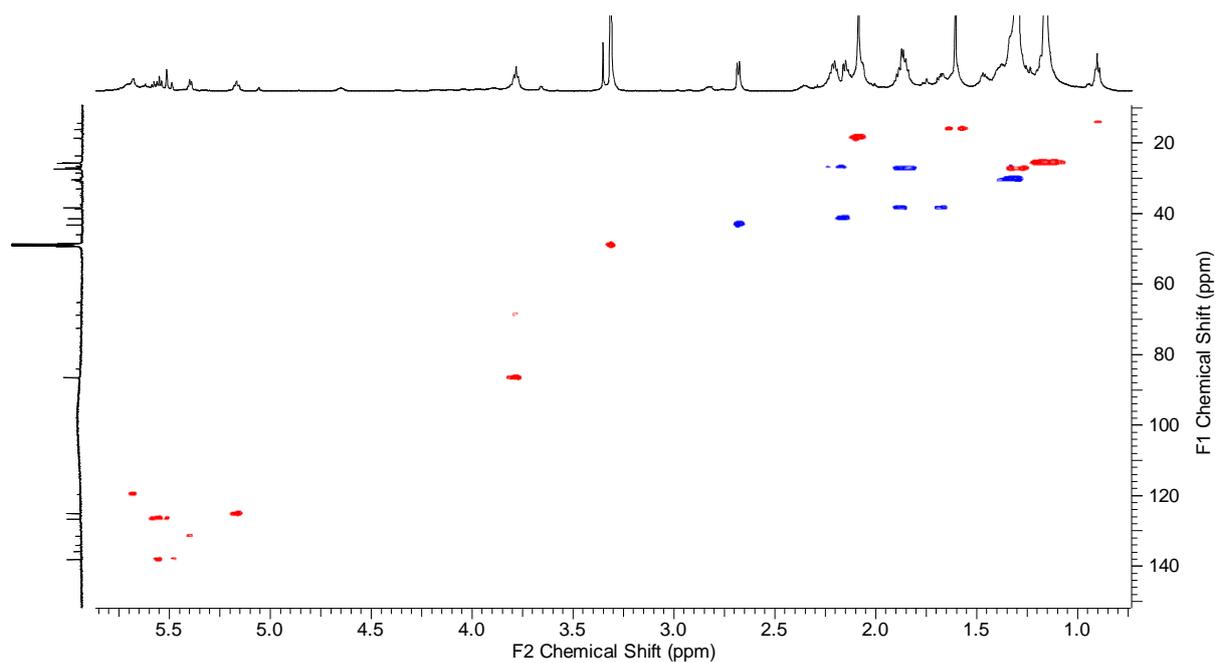


Figure S11. HSQC spectrum of **2** recorded at 600 MHz in CD₃OD

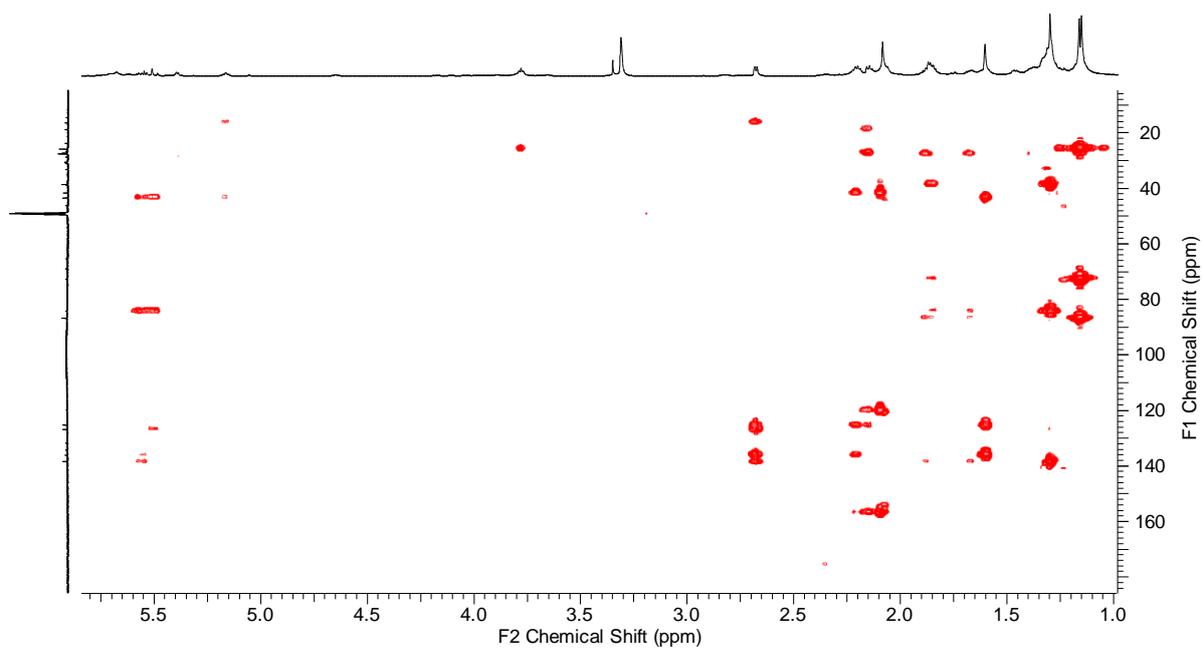


Figure S12. HMBC spectrum of **2** recorded at 600 MHz in CD₃OD

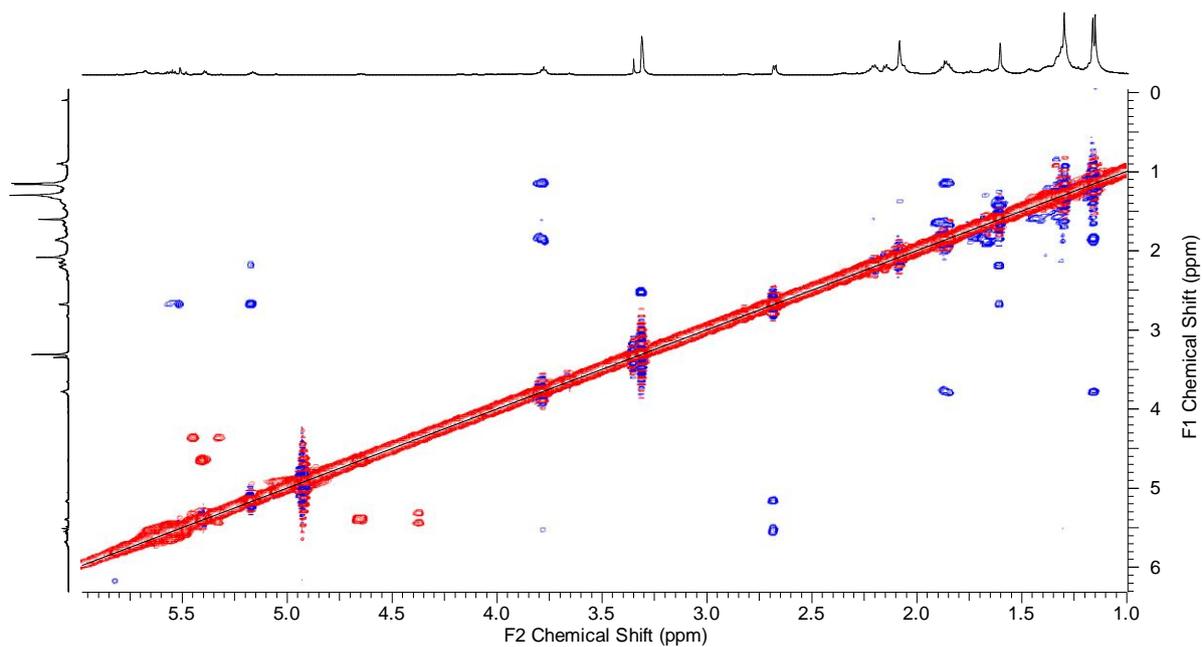


Figure S14. ROESY spectrum of **2** recorded at 600 MHz in CD₃OD

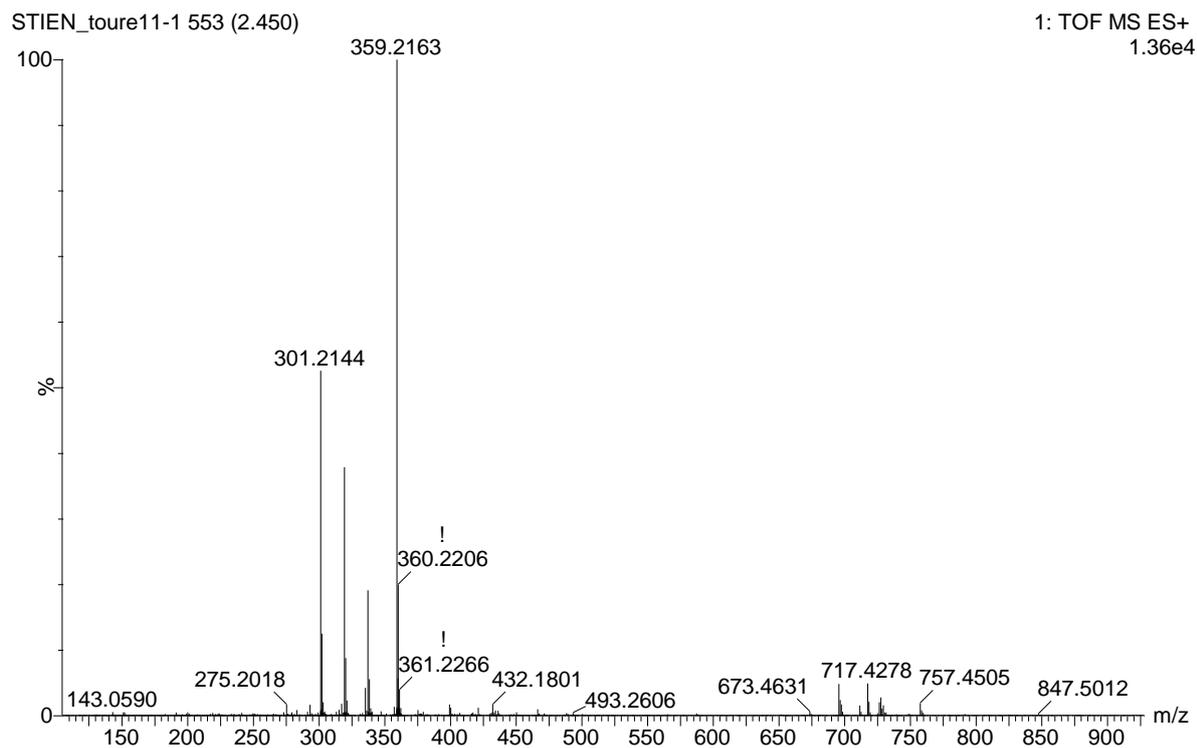


Figure S15. mass spectrum of **2**

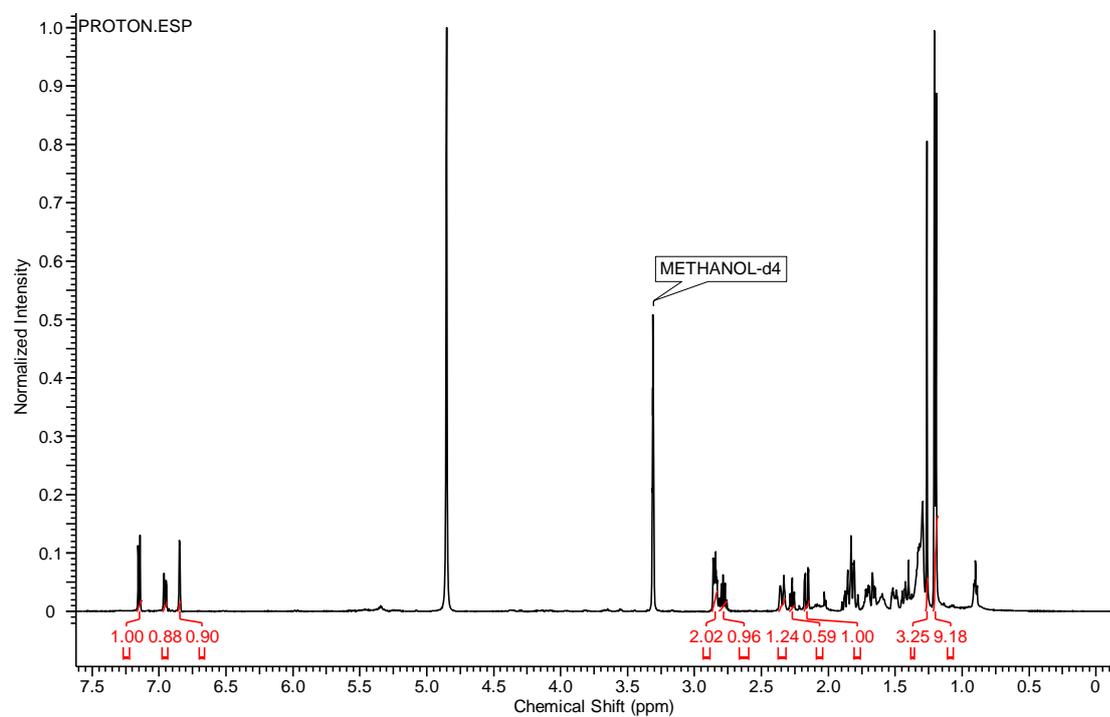


Figure S16. ^1H spectrum of **3** recorded at 500 MHz in CD_3OD

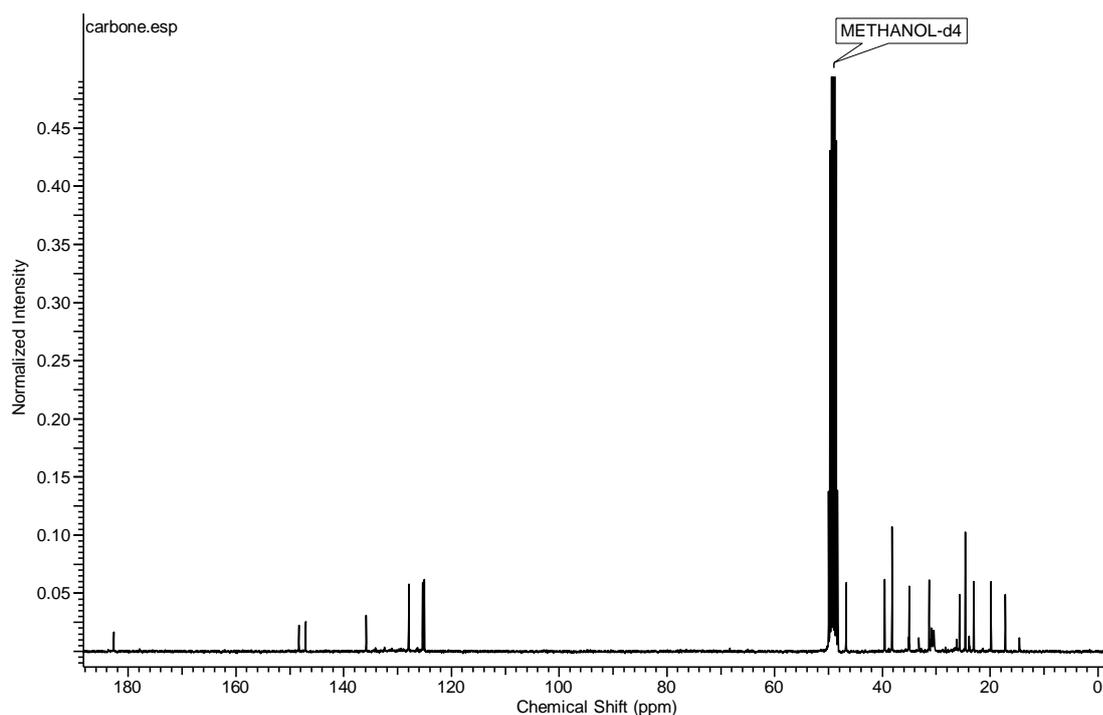


Figure S17. ^{13}C spectrum of **3** recorded at 125 MHz in CD_3OD

Table S3. Full spectral data for compound **4** in CD_3OD

Pos.	δ_{C}^a , type	δ_{H}^b (J in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	36.9, CH_2	a: 1.16, m b: 1.79, m		3, 5	2b
2	19.5, CH_2	a: 1.56, m b: 1.66, m	3	3	19 1b, 3a
3	38.2, CH_2	a: 1.56, m b: 1.79, m	2b, 5, 19	2, 19	2b 19
4	48.4, C				
5	47.8, CH	2.02, m	3a, 19, 6a, 6b	3, 19, 20, 6, 7, 9	7, (11b), 14a
6	22.8, CH_2	a: 1.32, m b: 1.61, m	5, 7 5, 7	3, 7, 8	
7	33.1, CH_2	1.92, m	6a, 6b		5, 11b, 14a
8	127.2, C				
9	138.9, C				
10	41.5, C				
11	25.8, CH_2	a: 1.90, m b: 2.08, m	12a	5, 8, 12	20, 16 (11), 7, 14a, 13, 14b
12	28.5, CH_2	a: 0.99, m b: 1.81, m	13	11, 12, 13	
13	42.1, CH	1.21, m	12b, 14a, 15, 17, 16	16	12a, 15, 17, 16
14	35.8, CH_2	a: 1.59, m b: 1.81, m	13	14, 8, 9, 13 7, 8, 9, 12, 13	5, 7, 11b, 16 16, 12a
15	34.0, CH	1.43, sept (6.9)	13	12, 13, 14, 17, 16	13, 17, 16
16	20.1, CH_3	0.89, d (4.3)	13	13, 15	13, 14a, 14b, 15
17	20.4, CH_3	0.90, d (4.3)	13	13, 15	13, 15
18	183.6, C				
19	17.4, CH_3	1.18, s	5, 3	18, 4, 3	3b, 2a, 20
20	19.8, CH_3	0.99, s		1, 5, 9	19, 11a

^a Data recorded at 150MHz. ^b Data recorded at 600MHz.

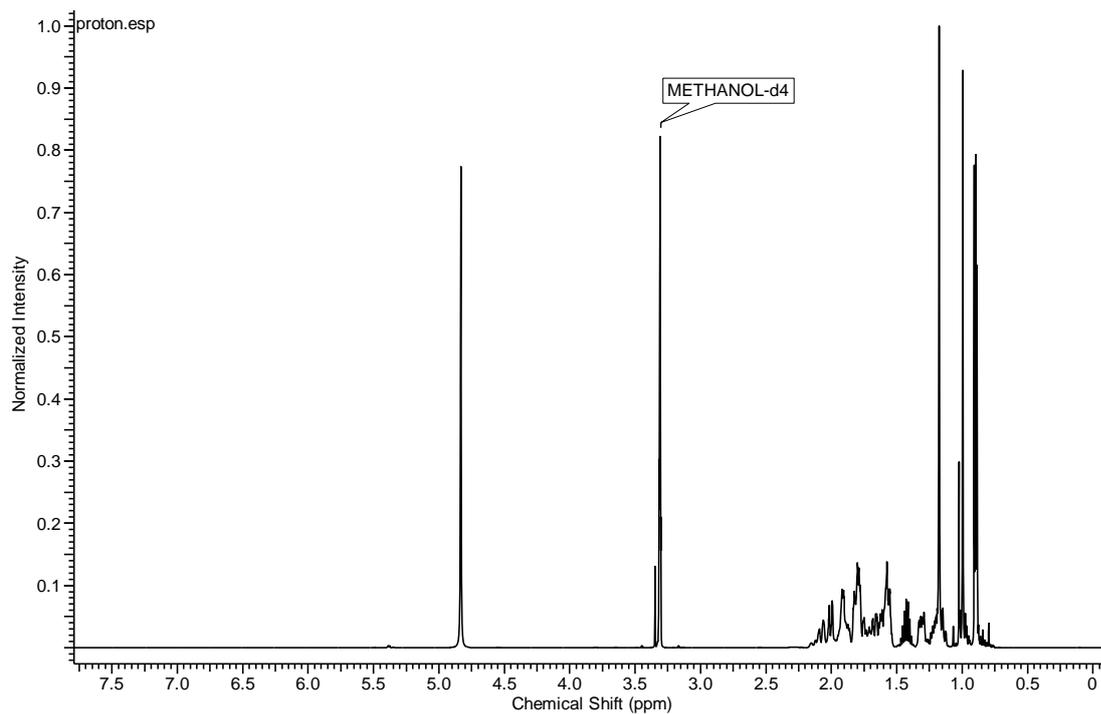


Figure S18. ¹H spectrum of **4** recorded at 600 MHz in CD₃OD

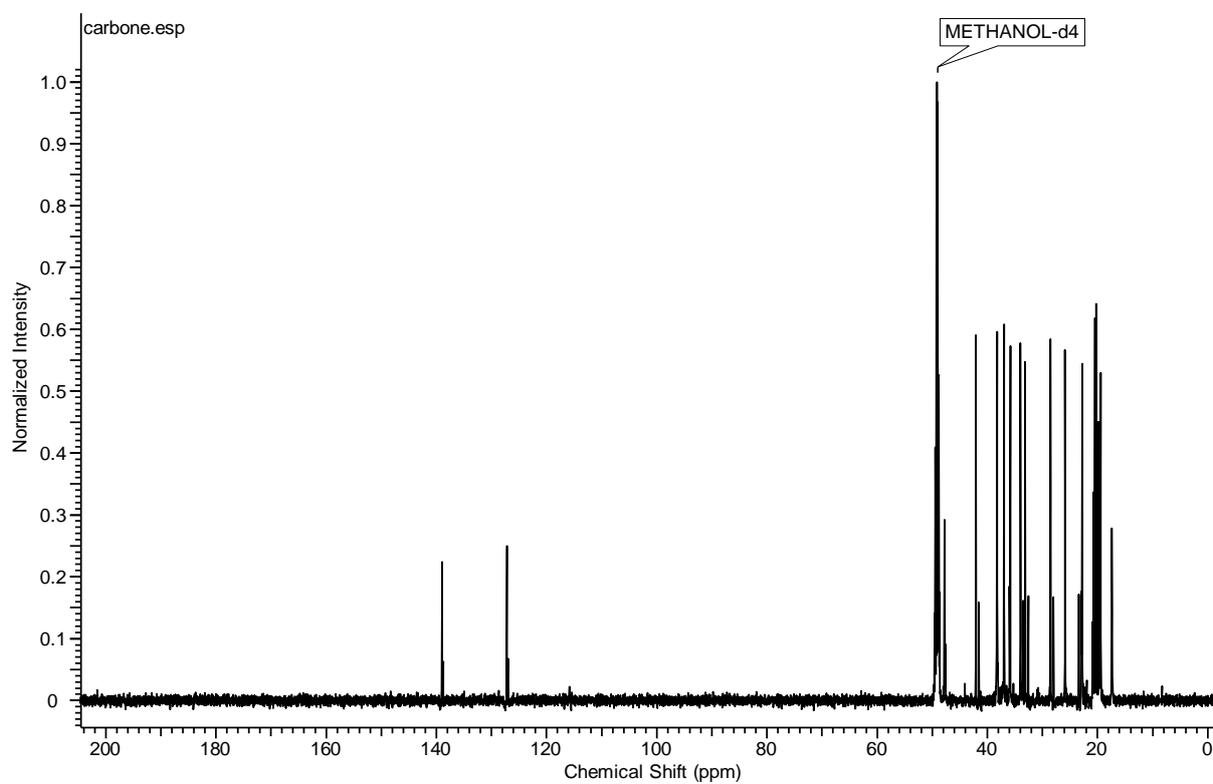


Figure S19. ¹³C spectrum of **4** recorded at 125 MHz in CD₃OD

Table S4. Full spectral data for compound **5** in CD₃OD

Pos.	δ_C^a , type	δ_H^b (J in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	37.4, CH2	a: 1.20, m b: 1.83, m	19	3	19
2	19.5, CH2	a: 1.66, m b: 1.78, m	3a		
3	38.3, CH2	a: 1.54, m b: 1.77, m	2b	1	
4	49.0, C				
5	47.9, CH	2.03	6b	4, 3, 19, 20, 6, 7, 9	
6	22.9, CH2	a: 1.32, m b: 1.61, m	5, 7a	10, 5, 8	
7	33.5, CH2	a: 1.87, m b: 1.93, m	6b	5, 8, 9	
8	126.1, C				
9	137.6, C				
10	32.3, C				
11	21.9, CH2	a: 1.93, m b: 2.02, m			
12	35.3, CH2	a: 1.21, m b: 1.39, m	15a	9, 14	
13	32.3, C				
14	44.1, CH2	a: 1.47, m b: 1.67, m	15b	8, 9, 12 8, 9, 13	16 20, 15b
15	37.2, CH2	a: 1.19, s b: 1.23, q (7.3)	12b 14a, 17	12, 13, 14	14b, 17
16	8.3, CH3	0.84, t (7.5)	15b	13, 15b	15b
17	22.5, CH3	0.79, s		12, 13, 14, 1	14a
18	183.7, C				
19	17.5, CH3	1.17, s	1b	18, 4, 3	1b, 13
20	20.1, CH3	1.01, s			19, 14b

^a Data recorded at 150MHz. ^b Data recorded at 600MHz.

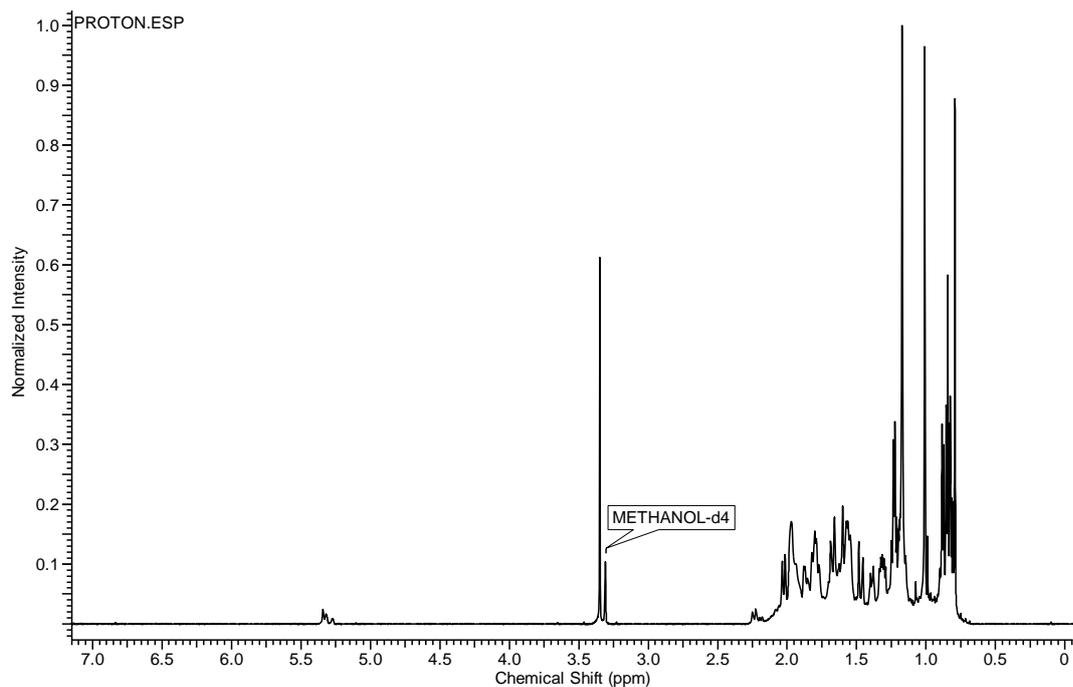


Figure S20. ¹H spectrum of **5** recorded at 600 MHz in CD₃OD

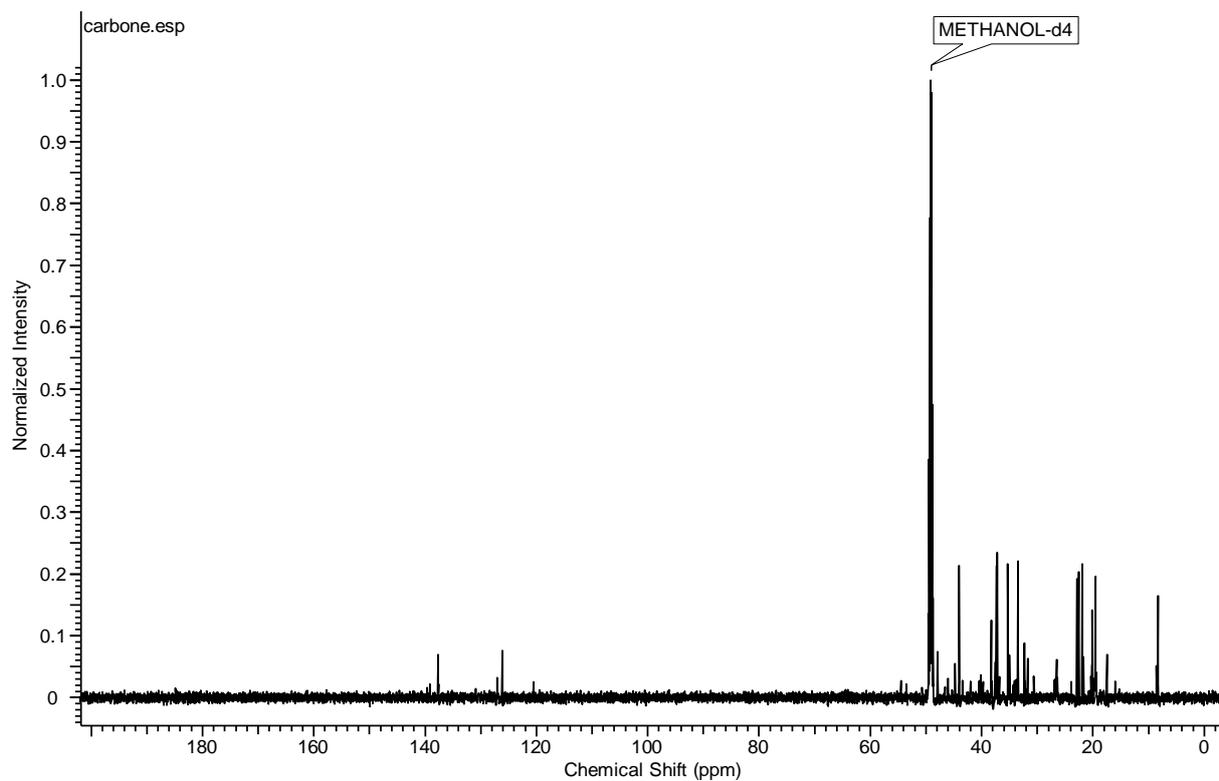


Figure S21. ¹³C spectrum of **5** recorded at 150 MHz in CD₃OD

References

- ¹ World Health Organization. *Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides*.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf (accessed august 2016).
- ² Abott WJ. *Econ. Entomol.* 1925; 18: 265–267.
- ³ Rodrigues AMS, Theodoro PNET, Eparvier V, Basset C, Silva MRR, Beauchêne J, Espindola L, Stien D. *J. Nat. Prod.* 2010; 73: 1706–1707.

Résultats complémentaires :

L'étude de l'extrait SNB-VECD11D a permis l'isolement d'un autre composé à partir de la fraction 1 de l'extrait heptanique de la seconde culture à grande échelle (Cf. Partie Expérimentale).

Isolé sous la forme d'un résidu blanc, l'analyse du spectre de masse haute résolution a présenté un pic d'ion moléculaire à m/z 459,3238 $[M-H]^-$ correspondant à la formule brute $C_{32}H_{44}O_2$ (masse calculée 459,3263).

L'analyse du spectre proton a mis en évidence la présence d'un singulet intégrant pour 6 protons correspondant à deux groupes méthyle (δ_H 2,22), 4 protons aromatiques (δ_H 6,86 ; 6,85 ; 6,84 ; 6,83), 6 méthines à δ_H 3,51 ; 2,80 ; 2,28 ; 2,24 ; 2,15 ; 2,08, et enfin deux grands signaux singulets intégrant pour 18 protons caractéristiques de deux groupements tertio-butyle.

L'analyse des spectres RMN 2D a permis de déduire la présence de deux systèmes aromatiques tri-substitué, chacun étant relié à un système central tricyclique (**Figure 41**). Les données de RMN 1D et 2D relatives à ce composé sont présentées dans le **Tableau 4** et les spectres de RMN 1D et 2D sont disponibles en Annexe.

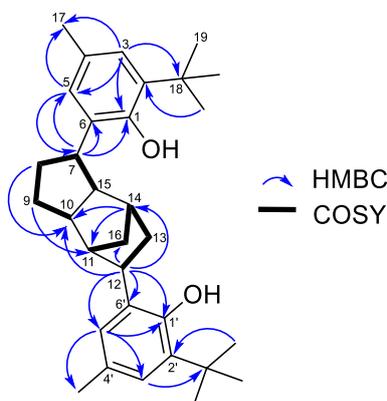


Figure 41: Corrélations COSY et HMBC clés du composé SNB-1

Tableau 4: Données RMN 1D et 2D relatif à la molécule SNB-1

Position	δ_C , type ^a	δ_H , m (J en Hz) ^b	COSY	HMBC	NOESY
1	151.8, C				
2	138.4, C				
3	125.5, CH	6.85	17	(1), 5, 17, 18	
4	129.0, C				
5	125.4, CH	6.84	7, 17	(1), 7, 17	
6	135.0, C				
7	40.4, CH	3.51	8b, 9	1, 5, 6, 10, 15	8b
8	a 39.8, CH ₂	1.60	8b, 15	9, 10	
		2.04	7, 8a, 9, 10	9, 10	7, 10
9	39.6, CH	1.64	7, 8b, 10	10, 11	
10	50.3, CH	2.28	8b, 9		8b, 12
11	47.5, CH	2.15, br s	16a		12
12	41.3, CH	2.80, dd (8.24, 5.14)	5', 13a, 13b, 16a	1', 5', 6', 10, 11, 13, 14, 16	10, 11, 13
13	a 39.1, CH ₂	1.43	12, 13b, 14, 16a		12
		1.85			
14	43.2, CH	2.08	13a, 16a	10, 11, 12	
15	49.4, CH	2.24	8a		
16	a 31.6, CH ₂	1.58	11, 12, 13b, 14		
		1.61			
17	21.5, CH ₃	2.22	3, 5		
18	35.7, C				
19	30.6, CH ₃	1.37		2, 18	
1'	152.1, C				
2'	138.2, C				
3'	125.8, CH	6.86	7'	(1'), 7', 8'	
4'	129.2, C				
5'	125.01, CH	6.83	7', 12	(1'), 3', 7', 12	
6'	135.7, C				
7'	21.5, CH ₃	2.22	3', 5'		
8'	35.7, C				
9'	30.6, CH ₃	1.39		2', 8'	

^a Enregistré à 125MHz dans le MeOD

^b Enregistré à 600MHz dans le MeOD

La structure pluri-cyclique et symétrique de ce composé nous a amené à douter quant à sa production par la souche SNB-VECD11D. Jamais décrite comme étant isolée d'une source naturelle, cette molécule est commercialisée et serait utilisée dans de nombreuses préparations en tant que stabilisatrice de polymères thermoplastiques ou en tant qu'antioxydant. Elle a d'ailleurs fait l'objet de nombreux brevets.^{216,217}

Afin de vérifier cette hypothèse de contamination de notre extrait, la souche a été cultivée et extraite à nouveau dans un autre laboratoire (le LBBM, à Banuyls-sur-mer) à partir de solvants distillés puis, l'extrait a été analysé par UHPLC-MS. Ce composé, bien

²¹⁶ PATENT <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?d=PALL&p=1&u=%2Fnetacgi%2FPTO%2Fsrchnum.htm&r=1&f=G&l=50&s1=6646035.PN.&OS=PN/6646035&RS=PN/6646035>

²¹⁷ PATENT <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?d=PALL&p=1&u=%2Fnetacgi%2FPTO%2Fsrchnum.htm&r=1&f=G&l=50&s1=7332535.PN.&OS=PN/7332535&RS=PN/7332535>

que minoritaire, n'a pas été retrouvé dans l'extrait. Il pourrait donc provenir des solvants ou stabilisants présents dans les solvants utilisés tout au long des étapes d'extraction, d'isolement et de purification.

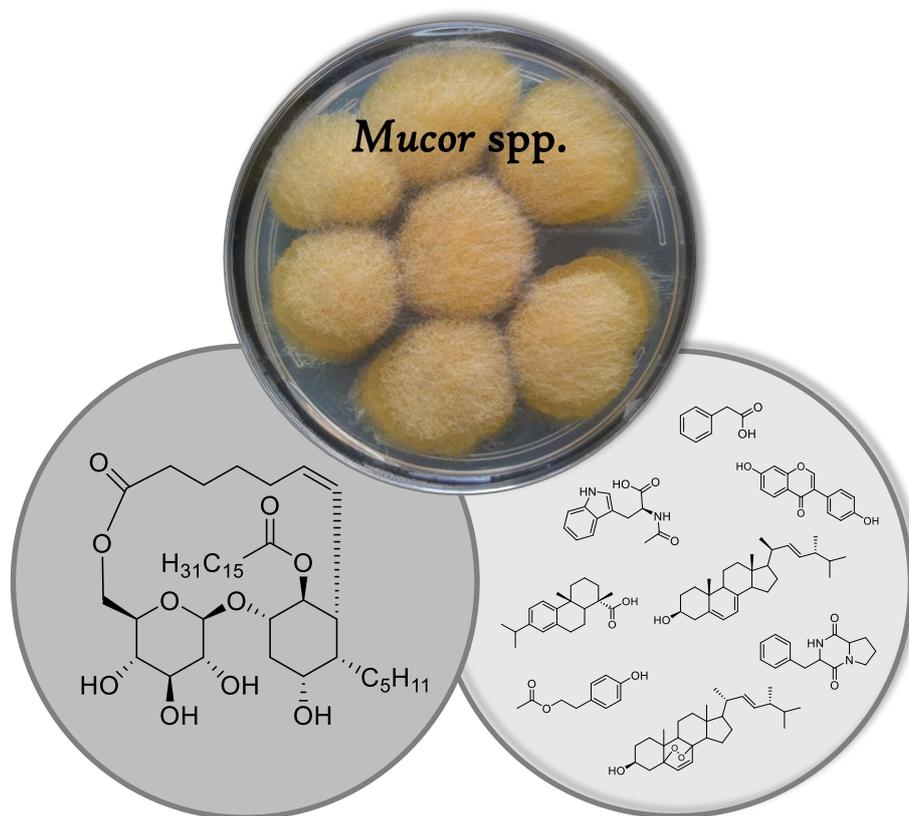
Bien que la molécule ne soit apparemment pas produite par notre souche, nous allons prochainement effectuer les essais biologiques afin de vérifier si elle a contribué ou non aux activités observées lors des essais biologiques.

3.2 Article 2: Mucorolactone, a unique macrolactone from *Mucor* spp. SNB-VECD13A, a fungus isolated from the cuticle of a Vespidae species

Ce second article présente les résultats obtenus lors de l'étude de l'extrait SNB-VECD13A. Plus précisément, nous y avons décrit l'isolement et la caractérisation d'une molécule nouvelle possédant un squelette original, nommée mucorolactone.

D'autres molécules ont été isolées de l'extrait à l'acétate d'éthyle de cette souche, parmi lesquelles des dicétopipérazines ainsi que deux stéroïdes connus.

Cet article est destiné au journal *Organic Letters*.



Mucorolactone, a unique macrolactone from *Mucor* spp. SNB-VECD13A, a fungus isolated from the cuticle of a Vespidae species

Seindé Touré^{†,‡}, Morgane Barthélémy^{†,‡}, Jonathan Sorres[†], Grégory Genta-Jouve[‡], Isabelle Dusfour[§], Véronique Eparvier^{†*}, Didier Stien^{+*}

[†] CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), Université Paris-Sud, 1 avenue de la terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

[‡] Université Paris Descartes, Laboratoire de Pharmacognosie et de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UMR 8638 COMETE, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

[§] Institut Pasteur de la Guyane (IPG), Unité de Contrôle et Adaptation des Vecteurs, 97306 Cayenne, Guyane française

⁺ Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

ABSTRACT

The new macrolactone mucorolactone (**1**), along with 8 known compounds were isolated from an ethyl acetate extract of the insect-born fungus *Mucor* spp. All structures were elucidated using 1D and 2D NMR and MS spectroscopic experiments. Relative configuration of the original skeleton of **1** was deduced from NOESY experiment and ¹³C NMR chemical shifts calculation based on the DP4 probability method.

Natural products are a historically successful option in the drug discovery and development process. They have an indispensable role to play, continue to provide and influence the search/development of current therapeutic in spite of the reduced level of natural-products-based drug discovery programs.¹ The recent decade has seen a growing recognition that natural products isolated from plants and animals may sometimes be the metabolic products of co-living microbes.² This fact brought researchers to the exploration of underrated ecological niches to identify novel chemical entities. This is how natural products regulating insect-microbe interactions appeared as a promising resource for drug discovery.^{3,4} These microorganisms, either mutualists or pathogens, generate a number of secondary metabolites involved in mechanisms of defence, protection, or virulence.^{5,6} Among them, entomopathogenic microorganisms are expected to produce insecticides and antimicrobials during the process of infection and proliferation.⁷ In our work, we undertook to explore secondary metabolites of the fungus *Mucor* spp. isolated from the cuticle of an alive, yet infected, unidentified wasp (Vespidae) collected in French Guiana.

Ethyl acetate extract of *Mucor* spp. SNB-VECD13A revealed strong larvicidal activity on *Aedes aegypti* larvae (mortality rate of 80% after 24 h of exposure at a dose of 100 µg/mL). A bioguided fractionation was performed on this extract and allowed isolation of new compound **1** (Figure 1), along with known dehydroabietic acid,⁸ cyclo(L-Pro-L-Phe),⁹ *N*-acetyltryptophane,¹⁰ daidzein,¹¹ 2-(4-hydroxyphenyl)ethyl acetate,¹² phenylacetic acid,¹³ ergosterol-5 α ,8 α -peroxide,¹⁴ and ergosta-5,7,22-trienol.¹⁵ Known compounds were identified by comparison of their analytical data with those from the literature (See the Supporting Information).

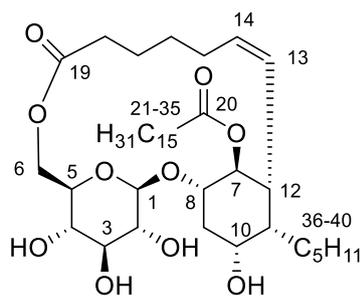


Figure 1. The structure of mucorolactone (**1**).

Compound **1** was obtained as a yellow oil. It has the molecular formula C₄₀H₇₀O₁₀, as deduced from the HR-ESI⁺-MS molecular ion sodium adduct at *m/z* 733.4881 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₀H₇₀O₁₀Na, 733.4879), corresponding to 6 degrees of unsaturation. The examination of the ¹H, ¹³C, and HSQC spectra of **1** allowed the identification of two triplet methyls at δ_{H} 0.89 and 0.90 and thirteen methines [δ_{H} 6.08, 5.46, 5.33, 4.44, 4.32, 4.13, 3.95, 3.73, 3.51, 3.34, 3.33, 3.15 and 2.85] among which two were olefinic protons (δ_{H} 6.08, H-13 and δ_{H} 5.46, H-14). Several methylenes were identified under a broad signal at δ_{H} 1.30. The ¹³C NMR spectrum of **1** showed the presence of two quaternary carbons corresponding to ester groups at δ_{C} 175.7 and 174.0 and nine oxygenated carbons between δ_{C} 63.1 and 106.1 (Table 1). The presence of a pyranose moiety was confirmed by the sequence of ¹H – ¹H COSY cross-peaks for H-1/H-2/H-3/H-4/H-5 and H-6 along with HMBC correlation H-1 to C-5 (Figure 2). Additional sequence of ¹H – ¹H cross-peak H-7/H-8/H-9/H-10 and H-11 along with HMBC correlations between H-8/C-9, H-10/C-8 and C-12, H-11/C-12, and H-12/C-7 and C-10 allowed the determination of another six-membered ring linked to the pyranose moiety by C-8 as shown by the H-1/C-8 and H-8/C-1 correlations (Figure 2).

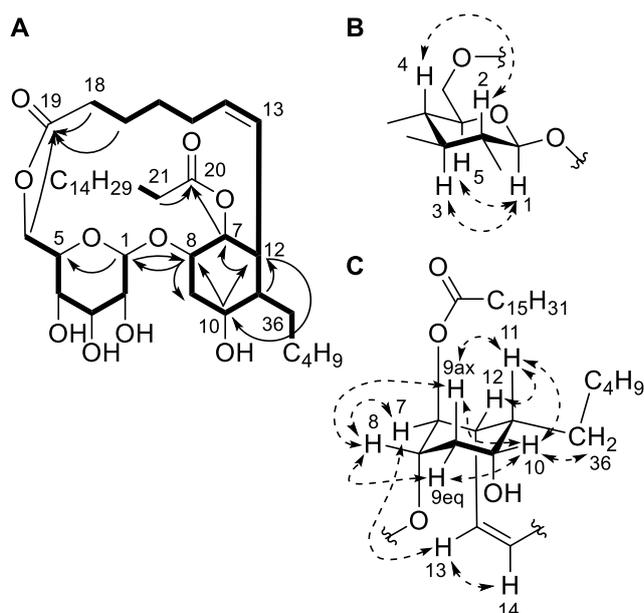


Figure 2. A) COSY (bold), and key HMBC (plain arrows) correlations in compound **1**; B) Key NOE correlations in the glucose moiety (dashed arrows). Note that the hydroxyl groups in positions 2-4 have not been represented for clarity; C) Key NOE correlations in the cyclohexane ring (dashed arrows).

The ^1H - ^1H COSY sequence signal from H-12 to H-18 established a carbon side chain linked to C-12 and including the two methines H-13 and H-14 in a *cis* double bond ($J = 11.3$ Hz, Figure 2). HMBC cross signals H-6/C-19 and H-18/C-19 confirmed the C-6 –O–C-19 linkage demonstrating the presence of a macrolactone. Correlation H-7/C-20 and ^1H - ^1H coupling between H-11 and H-36 allowed us to attach an alkyl side chain in C-11 and a fatty acid chain in C-7. The relative length of both side chains could not be established by NMR due to extensive overlapping of the CH_2 signals in ^1H and ^{13}C . In LC-ESI-MS², the fragmentation of the pseudomolecular ion yielded two characteristic fragments at m/z 255.2323 ($[\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2]^-$) and 471.2584 ($[\text{M}-\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}]^-$). These originate from the cleavage of the C-7–O and the O–C-20 bonds, respectively (Scheme 1). In LC-ESI⁺-MS², the $[\text{M}+\text{Na}]^+$ adduct fragmented to give a daughter ion at m/z 477.2457 ($[\text{M}+\text{Na}-\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2]^+$). All these findings are consistent with the existence of palmitate esters on C-7 and a five-carbon side chain in C-11.

Scheme 1. LC-MS² Fragmentation of **1** (left: positive mode; right: negative mode)

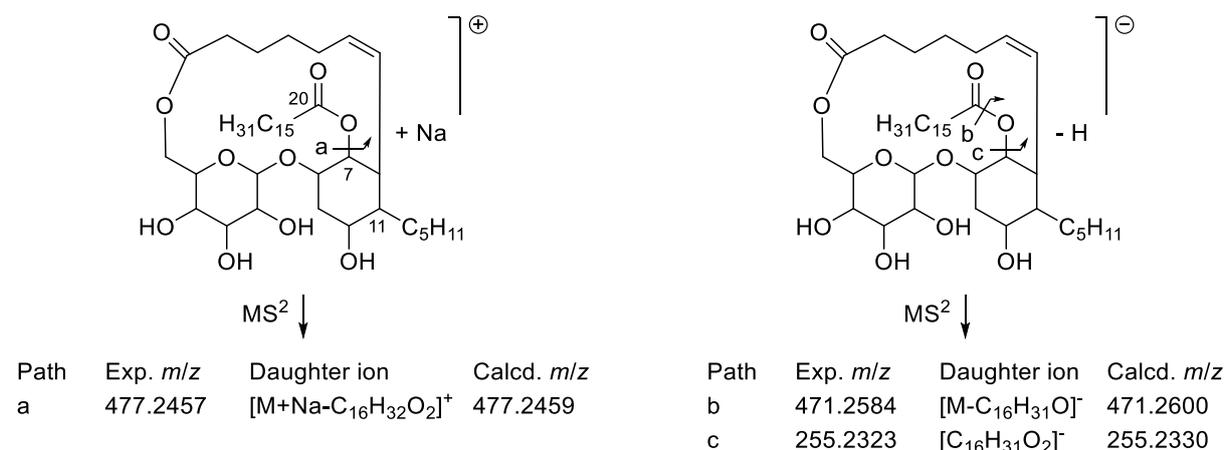


Table 1. ¹H and ¹³C NMR Data of compound **1**^a

no.	1	
	δ_{H} , mult (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	4.32, d (7.6)	106.1
2	3.15, dd (9.4, 7.6)	75.5
3	3.329, br t (9.3)	77.5
4	3.51, br t (9.8)	70.6
5	3.332, br dt (9.5, 2.1)	74.6
6	a: 4.13, dd (11.7, 1.6) b: 4.44, dd (11.7, 2.5)	63.2
7	5.33, br t (2.7)	76.0
8	3.73, br q (2.5)	77.3
9	ax: 2.04, dt (15.2, 3.8) eq: 2.12, br d (15.2)	34.5
10	3.95, br q (2.1)	70.1
11	1.71, m	38.6
12	2.85, br d (10.0)	39.1
13	6.08, br t (10.7)	131.1
14	5.46, br td (11.2, 5.2)	130.8
15	a: 1.76, m b: 2.43, m	27.6
16	1.50, m	31.0
17	a: 1.64, m b: 1.84, m	26.5
18	a: 2.27, ddd (13.8, 8.8, 5.2) b: 2.41, m	36.6
19		175.6
20		174.0
21	a: 2.29, dt (15.0, 7.3) b: 2.33, dt (15.0, 7.3)	35.6
22	1.61, m	26.5
23-34	1.21-1.35, m	23.8 to 33.3
35/40	0.89/0.90, t (7.0)	14.6
36	1.42, m	31.3
37-39	1.21-1.35, m	23.8 to 33.3

^a Measured at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C, in methanol-*d*₄

Anomeric proton configuration was assigned based on H-1 chemical shift and on the coupling constant value of 7.6 Hz between H-1 and H-2. These are consistent with a β -configuration. Based on the same principle, vicinal coupling constant between the successive pyranose protons informed about their relative configuration. Large J couplings observed within the sequence H-2 to H-5 confirmed the axial configuration of H-2, H-3, H-4 and H-5. These orientations were confirmed by the NOESY spectrum where correlations were observed between the anomeric proton H-1 (δ_{H} 4.32) and H-3 and/or H-5, and between H-2 and H-4. The pyranose was therefore defined as a glucose moiety. The relative stereochemistry in the cyclohexane ring was determined as follows. First, H-8 and H-10 both have 3 small vicinal coupling constants ($J \approx 2.5$ Hz and $J \approx 2.1$ Hz, respectively). Since one of the H-9 proton is necessarily axial, then H-8 and H-10 must be equatorial. The axial H-9 proton at δ 2.04 could be identified thanks to the NOE correlation with H-11. H-12 has one large coupling with H-13 and two small couplings with H-11 and H-7. Since H-11 is axial, then H-12 had to be equatorial. This was confirmed by the NOE correlation between H-11 and H-12. Finally, the COSY experiment indicated that H-7 was coupled with H-9_{eq} (W-coupling) and should therefore be equatorial. This assumption was reinforced by the NOE coupling between H-7 and H-13. The only stereochemical information linking the glucose to the cyclohexane ring is a NOE correlation between H-1 and H-8. However, this was not enough to find out the relative configurations of these two moieties (Figure 3). A ^{13}C NMR chemical shifts calculation by the DP4 probability method was performed.¹⁶ Due to the flexibility of the compound, ^{13}C NMR calculations have been performed on the conformers within 1 kcal.mol⁻¹ using Gaussian 09W with the B3LYP method at the 6-311+G(d,p) level. The Boltzmann weighted chemical shift have been compared to the experimental one using the Java applet available at <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>. The diastereoisomer **a** was deduced to be correct with a 100% probability.

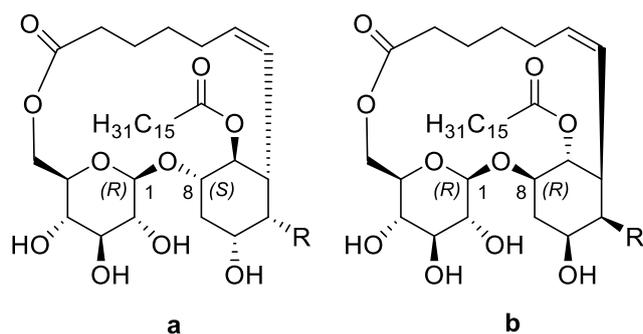


Figure 3. Both possible diastereoisomers of **1** (R = Pentyl).

In conclusion, this letter reports the first description of mucorolactone (**1**), a unique macrocyclic compound isolated from a fungus of the genus *Mucor*. Interestingly, the right side of compound **1**, from the ester group in C-19 to the pentyl side chain (C-36–C40), seems to be formed by cyclization (formation of the C-11–C-12 bond) and oxidation of γ -linolenic acid to generate the functionalized cyclohexane ring. If some bacteria from the *Alicyclobacillus* and *Sulfobacillus* genera are known to produce ω -

cycloalkyl fatty acids,¹⁷ there is no example of natural cyclohexane ring formed in the middle of the fatty acid chain. The closest analogs may be in the prostanoid series, with a 5-membered ring formed by oxidative cyclization of C20 fatty acids, although the biosynthetic route towards mucorolactone cyclohexanic fatty acid is not likely related.¹⁸ It will be interesting to investigate further the biosynthetic pathway leading to the formation of mucorolactone, the major secondary metabolites of *Mucor* sp. SNB-VECD13A.

ASSOCIATED CONTENTS

Supporting Information

Detailed experimental procedures. NMR and MS data. The supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI:

AUTHORS INFORMATION

Corresponding author

* (V. Eparvier) Tel.: +33 1 69 82 36 79; e-mail: veronique.eparvier@cnrs.fr

* (S. Didier) Tel. : +33 4 30 19 24 76; e-mail: didier.stien@cnrs.fr

Note

|| These authors contributed equally to this work.

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was part of the Laboratory of Excellence « Centre de la Biodiversité Amazonienne » (Labex CEBA, (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01)). The authors are very grateful to C. Gourmel (BioSavane association) for collecting the infected insects and C. Duplais to transfer the biological material included in Funchem, the collaborative project of CEBA Labex. The authors also acknowledge Marcelino Suzuki for constructive discussions.

REFERENCES

- (1) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629–661.
- (2) Crawford, J. M.; Clardy, J. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7559–7566.
- (3) Challinor, V. L.; Bode, H. B. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2015**, *1354*, 82–97.
- (4) Traxler, M. F.; Kolter, R. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 956–970.
- (5) Kaltenpoth, M. *Trends Microbiol.* **2009**, *17*, 529–535.
- (6) Bode, H. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6394–6396.
- (7) Jan Scholte, E.; Knols, B.G.; Samson, R. A.; Takken, W. J. *Insect Sci.* **2004**, *4*, 1–24.
- (8) Touré, S.; Dusfour, I.; Stien, D.; Eparvier, V. *Tet. Let.* **2017**, *58*, 3727–3729.
- (9) Ding, L.; Yuan, W.; Sun, H.; Xu S. *Chem. Nat. Comp.* **2016**, *52*, 969–970.
- (10) Yong-Sheng, J.; Jing-Ling, D.; Yan, Y.; Li J.; Yan S.; Wei Z.; Hai-Sheng C. *Chem. Nat. Comp.* **2011**, *47*, 257–260.
- (11) Liu, B.; Kongstad, K. T.; Qinglei, S.; Nyberg, N. T.; Jäger, A. K.; Staerk, D. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 294–300.
- (12) Pfaff, D.; Nemecek, G.; Podlech, J. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 1572–1577.
- (13) Malineni, J.; Keul, H.; Möller, M. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 17409–17414.
- (14) Wu, Q-P.; Xie, Y-Z.; Deng, Z.; Li, X-M.; Yang, W.; Jiao, C-W.; Fang, L.; Li, S-Z.; Pan, H-H.; Yee, A. J.; Lee, D. Y.; Li, C.; Zhnag, Z. Guo, J.; Yang, B. B. *PloS One.* **2012**, *7*, e44579.
- (15) Zhao, J.; Mou, Y.; Shan, T.; Li, Y.; Zhou, L.; Wang, M.; Wang, J. *Molecules.* **2010**, *15*, 7961–7970.
- (16) Smith, S. G.; Goodman, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12946–12959.
- (17) Ciuffreda, E.; Bevilacqua, A.; Sinigaglia, M.; Corbo, M. R. *Microorg.* **2015**, *3*, 625–640.
- (18) Wolfe, L. S.; Shimizu, T. J. *Neurochem.* **1990**, *55*, 1–5.

SUPPORTING INFORMATION FOR :

Mucorolactone, a unique macrolactone from *Mucor* spp. SNB-VECD13A, a fungus isolated from the cuticle of a Vespidae species

Seindé Touré[†], Morgane Barthélémy[†], Jonathan Sorres[†], Grégory Genta-Jouve[‡], Isabelle Dusfour[§], Véronique Eparvier^{†*}, Didier Stien^{+*}

[†] CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), Université Paris-Sud, 1 avenue de la terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

[‡] Université Paris Descartes, Laboratoire de Pharmacognosie et de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UMR 8638 COMETE, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

[§] Institut Pasteur de la Guyane (IPG), Unité de Contrôle et Adaptation des Vecteurs, 97306 Cayenne, Guyane française

⁺ Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

* Corresponding authors : E.mail:

* (V. Eparvier) : veronique.eparvier@cnrs.fr

* (S. Didier) : didier.stien@cnrs.fr

Tables of contents

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures

Collection and Identification of *Mucor* spp. SNB-VECD13A

Culture, Extraction and Isolation

Physical and spectroscopic data of isolated compounds

Spectral data of **1**

Table S1. Full NMR data of **1**

Figure S1. ¹H-NMR spectra of **1** in methanol-*d*₄ (500 MHz)

Figure S2. ¹³C-NMR spectrum of **1** in methanol-*d*₄ (125 MHz)

Figure S3. COSY spectrum of **1** in methanol-*d*₄ (500 MHz)

Figure S4. HSQC spectrum of **1** in methanol-*d*₄ (500 MHz)

Figure S5. HMBC spectra of **1** in methanol-*d*₄ (500 MHz)

Figure S6. NOESY spectrum of **1** in methanol-*d*₄ (500 MHz)

Figure S7. LC-MSMS spectra of **1**

Table S2. Cartesian coordinates of the 1a conformers

Table S3. Cartesian coordinates of the 1b conformers

EXPERIMENTAL SECTION

1. General Experimental Procedures. Optical rotations were obtained on an Anton Paar MCP 200 polarimeter in a 100mm long 350 μ L cell using MeOH as a solvent at 20°C. High resolution ESITOFMS measurements were performed using a Waters Acquity UPLC system coupled to Waters Micromass LCT-Premier time of flight mass spectrometer equipped with an electrospray interface (ESI). NMR data were recorded in MeOD on a Bruker 500 MHz or 600 MHz spectrometer equipped with a 1 mm inverse detection probe. Chemical shift (δ) are reported as ppm based on TMS signal. Flash chromatography was performed on a Grace Reveleris system with dual UV and ELSD detectors equipped with an 80g silica column. TLC was conducted on 60 A F254 Merck plates and visualized using UV light and phosphomolybdic acid. Analytical and preparative HPLC work was conducted with a Gilson system equipped with a 322 pumping device, a GX-271 fraction collector, a 171 diode array detector and a prepELSII detector electrospray nebulizer. Columns used for these experiments included a Phenomenex Luna C₁₈ (5 μ m, 4.6 x 250 mm) and a Phenomenex Luna PFP (5 μ m, 4.6 x 250 mm) analytical columns. The preparative columns were a Phenomenex luna C₁₈ (5 μ m, 21.2 x 250 mm) and a Phenomenex Luna PFP (5 μ m, 21.2 x 250 mm) preparative columns. The flow rate was set up to 1 or 21 mL/min, respectively, using a linear gradient of H₂O mixed with an increasing proportion of CH₃CN or MeOH. All solvents were modified with 0.1% formic acid. All solvents were HPLC grade.

2. Collection and Identification of *Mucor* spp. SNB-VECD13A. An individual of the insect species *Vespidae* infected by entomopathogenic microorganisms was collected in Montsinéry, French Guiana. The cuticle of the insect was scraped with a handle and transplanted on a Petri dish containing a solid Potato Dextrose Agar (PDA) medium and then stored at 28 °C. After one day, growing fungi hyphae were removed and transferred into another Petri dish. The strain SNB-VECD13A was saved in triplicate at -80 °C in H₂O – Glycerol (50/50). A sample was submitted for amplification of nuclear ribosomal internal transcribed spacer region ITS1 which allowed identification by comparison with NCBI sequence. The sequence was registered in the NCBI Genbank database with the accession number KX858867 and identified as *Mucor* spp. Molecular analysis was performed externally by BACTUP, France.

3. Culture, Extraction and Isolation. The fungal strain was cultivated on Petri dishes of PDA solid medium initially on a small scale then on 450 14-cm Petri Dishes at 28 °C during 15 days. The culture medium containing the mycelium was cut into small pieces and macerated with ethyl acetate (EtOAc) at room temperature on a rotary shaker (70 rpm) during 48h. The content was extracted three times with EtOAc (3 x 5 L) in a separating funnel. The combined organic layers were washed with water. The organic solvent was evaporated to dryness under reduced pressure to yield the crude extract (2.94 g). A part of the crude extract (2.88 g) was fractionated by reverse flash

chromatography on C₁₈ column with linear gradient water – acetonitrile (v/v, 1:0 to 0:1 in 25 min, flow rate 80 mL/min) followed by another gradient of acetonitrile – methylene chloride (v/v, 1:1 to 0:1 in 15 min, flow rate 80 mL/min) to generate 9 fractions, from 1 to 9. The larvicidal and antimicrobial activities were concentrated in fractions 5 (470.5 mg), 6 (105.8 mg), 7 (81.2 mg) and 8 (330.0 mg). Upon further fractionation of fraction 5 using flash chromatography on C₁₈ column with linear gradient water – acetonitrile (v/v, 1:0 to 0:1 in 35 min, flow rate 40 mL/min) followed by acetonitrile – methylene chloride (v/v, 1:1 to 0:1 in 10 min, flow rate 40 mL/min) afforded 9 subfractions from A to I. Therefore, fractions 5B was fractionated by preparative HPLC with water – MeOH (isocratic 40:60 during 25 min, flow rate 21 mL/min) to afford compound **3** (4 mg, 0.13888%, *t_R* 12.6 min) and compound **4** (1.3 mg, 0.04513%, *t_R* 17.3 min). The fraction 5C, fractionated by preparative HPLC on PFP column with water – acetonitrile (v/v, 8:2 to 6:4 in 20 min, flow rate 21 ml/min) has afforded compound **7** (18.1 mg, 0.62847%, *t_R* 16.3 min). The fraction 5E, fractionated by preparative HPLC with water – acetonitrile (isocratic 3:7 during 17 min, flow rate 21 ml/min) has afforded compound **5** (0.7 mg, 0.02430%, *t_R* 13.0 min) and compound **6** (5.7 mg, 0.19791%, *t_R* 16.2 min). The fraction 7 afforded acid dehydroabiatic (**2**) (17.1 mg, 0.59375%) as a white precipitate observed in flash chromatography tube (water – acetonitrile, v/v, 0:1, flow rate 80 ml/min). The fraction 8 was first fractionated using flash chromatography on silica column with linear gradient water – methanol (v/v, 0:1 to 2:8 in 23 min, flow rate 30 ml/min) to afford 5 subfractions, from A to E. The subfraction 8C was then purified by TLC on silice with AcOEt – methylene chloride (v/v, 9:1) to afford compound **8** (1.4 mg, 0.04861%). The fraction 9 afforded compound **1** (4.5 mg, 0.15625%) and compound **9** (34.4 mg, 1.19444%) as a white precipitate observed in flash chromatography tubes (acetonitrile – methylene chloride, v/v, 1:1, flow rate 80 ml/min).

4. Physical and spectroscopic data of isolated compounds

Mucorolactone (1): yellow oil; $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$: -30.00° (*c* 0.05, MeOH); **¹H and ¹³C NMR** spectroscopic data, see **Table S1**; **HRESITOFMS** *m/z* 733.4881 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₀H₇₀O₁₀Na, 733.4879).

Dehydroabiatic acid (2): yellow oil; $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$: $+58.00^{\circ}$ (*c* 0.05, MeOH); **¹H NMR (in methanol-*d*₄, 500MHz)** δ_{H} 7.15 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-11), 6.95 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, H-12), 6.85 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-14), 2.85 (2H, m, H-7), 2.78 (1H, sept, *J* = 7.0 Hz, H-15), 2.34 (1H, m, H-1a), 2.16 (1H, dd, *J* = 12.4, 2.0 Hz, H-5), 1.90-1.78 (3H, m, H-6a, H-2a, H-3a), 1.71 (1H, m, H-2b), 1.66 (1H, m, H-3b), 1.51 (1H, m, H-6b), 1.43 (1H, m, H-1b), 1.26 (3H, s, H-20), 1.21 (6H, d, *J* = 7.0 Hz, H-16), 1.20 (3H, s, H-19); **¹³C NMR (in methanol-*d*₄, 125MHz)** δ_{C} 182.6 (C-17), 148.4 (C-9), 146.8 (C-13), 127.8 (C-14), 125.1 (C-11), 124.9 (C-12), 48.5 (C-4), 46.6 (C-5), 39.4 (C-1), 38.1 (C-10), 37.9 (C-3), 34.7 (C-15), 31.2 (C-7), 25.8 (C-19), 24.5 (C-16), 22.7 (C-6), 19.4 (C-2), 16.9 (C-18); **HRESITOFMS** *m/z* 301.2171 [M + H]⁺ (calcd for C₂₀H₂₉O₂, 301.2162).

Cyclo(L-Pro-L-Phe) (3): white powder; $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$: -76.00° (c 0.05, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (in methanol- d_4 , 500MHz) δ_{H} 7.30- 7.21 (5H, m), 4.44 (1H, m), 4.09-4.05 (1H, m), 3.57-3.52 (1H, m), 3.40-3.35 (1H, m), 3.17 (2H, d, $J = 5.1$ Hz), 2.13-2.07 (1H, m), 1.84-1.78 (2H, m), 1.28-1.20 (1H, m); **HRESITOFMS** m/z 245.1299 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$, 245.1285).

N-Acetyl tryptophane (4): white powder; $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ $+18.00^\circ$ (c 0.05, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (in methanol- d_4 , 500MHz) δ_{H} 7.56 (1H, dt, $J = 8.0, 1.0$ Hz), 7.31 (1H, dt, $J = 8.0, 1.0$ Hz), 7.08 (1H, s), 7.07 (1H, m), 6.99 (1H, m), 4.68 (1H, m), 3.35 (1H, dd, $J = 14.4, 5.0$ Hz), 3.16 (1H, dd, $J = 14.8, 7.7$ Hz), 1.89 (3H, s); **HRESITOFMS** m/z 247.1090 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3$, 247.1077).

Daidzen (5): white powder; $^1\text{H NMR}$ (in methanol- d_4 , 500MHz) δ_{H} 8.13 (1H, s), 8.06 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.38- 7.32 (2H, m), 6.94 (1H, dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz), 6.86-6.84 (3H, m); **HRESITOFMS** m/z 255.0655 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_4$, 255.0652).

2-(4-hydroxyphenyl)ethyl acetate (6): white powder; $^1\text{H NMR}$ (in methanol- d_4 , 500MHz) δ_{H} 7.04 (2H, m, H-6), 6.71 (2H, m, H-7), 4.19 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-3), 2.82 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-4), 2.00 (3H, s, H-2); $^{13}\text{C NMR}$ (in methanol- d_4 , 125MHz) δ_{C} 173.1 (C-1), 157.26 (C-8), 131.0 (C-6), 130.1 (C-5), 116.4 (C-7), 66.8 (C-3), 35.4 (C-4), 20.9 (C-2); **HRESITOFMS** m/z $[\text{M} - \text{COOCH}_3]$ (calcd for $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}$).

Phenylacetic acid (7): white powder; $^1\text{H NMR}$ (in methanol- d_4 , 500MHz) δ_{H} 7.28 (4H, m), 7.23 (1H, m), 3.59 (2H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (in methanol- d_4 , 125MHz) δ_{C} 175.8 (C-1), 136.3 (C-3), 130.5 (C-4, C-8), 129.6 (C-5, C-7), 128.0 (C-6), 42.2 (C-2); **HRESITOFMS** (calcd for $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_2$, 137.0597).

Ergosterol-5 α ,8 α -peroxide (8): white powder; $^1\text{H NMR}$ (in methanol- d_4 , 500MHz) δ_{H} 6.54 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-7), 6.26 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 5.25 (1H, dd, $J = 15.0, 7.7$ Hz, H-22), 5.18 (1H, dd, $J = 15.4, 7.7$ Hz, H-23), 3.77 (1H, sp, $J = 8.1$ Hz, H-3), 1.02 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.94 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-26), 0.91 (3H, H-27), 0.86 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-28); $^{13}\text{C NMR}$ (in methanol- d_4 , 125MHz) δ_{C} 40.8 (C-1), 30.9 (C-2), 66.1 (C-3), 37.9 (C-4), 83.7 (C-5), 136.9 (C-6), 131.8 (C-7), 80.9 (C-8), 52.8 (C-9), 38.2 (C-10), 24.5 (C-11), 36.0 (C-12), 45.8 (C-13), 53.2 (C-14), 21.5 (C-15), 24.5 (C-16), 57.7 (C-17), 18.2 (C-18), 18.4 (C-19), 41.3 (C-20), 18.7 (C-21), 136.9 (C-22), 133.6 (C-23), 44.5 (C-24), 34.5 (C-25), 20.6 (C-26), 20.2 (C-27), 18.3 (C-28); **HRESITOFMS** m/z 429.3376 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{O}_3$, 429.3363).

Ergosta-5,7,22-trienol (9): white powder; $^1\text{H NMR}$ (in methanol- d_4 , 500MHz) δ_{H} 5.58 (1H, dd, $J = 5.5, 2.2$ Hz, H-6), 5.39 (1H, m, H-7), 5.23 (1H, dd, $J = 15.2, 7.1$ Hz, H-23), 5.19 (1H, dd, $J = 15.3, 7.7$ Hz, H-22), 3.65 (1H, m, H-3), 1.04 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 0.95 (3H, s), 0.92 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.85 (3H, d, $J = 7.1$ Hz), 0.83 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.64 (3H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (in methanol- d_4 , 125MHz) δ_{C} 38.3 (C-1), 32.0 (C-2), 70.4 (C-3), 40.8 (C-4),

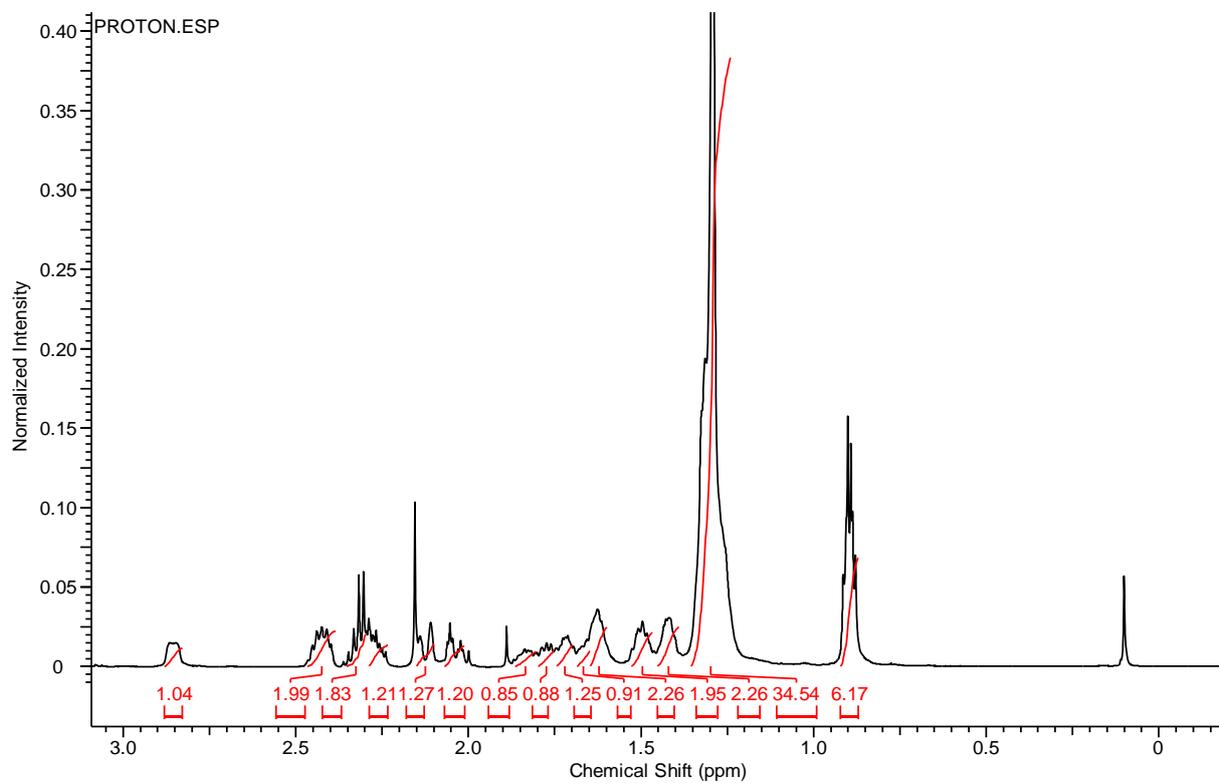
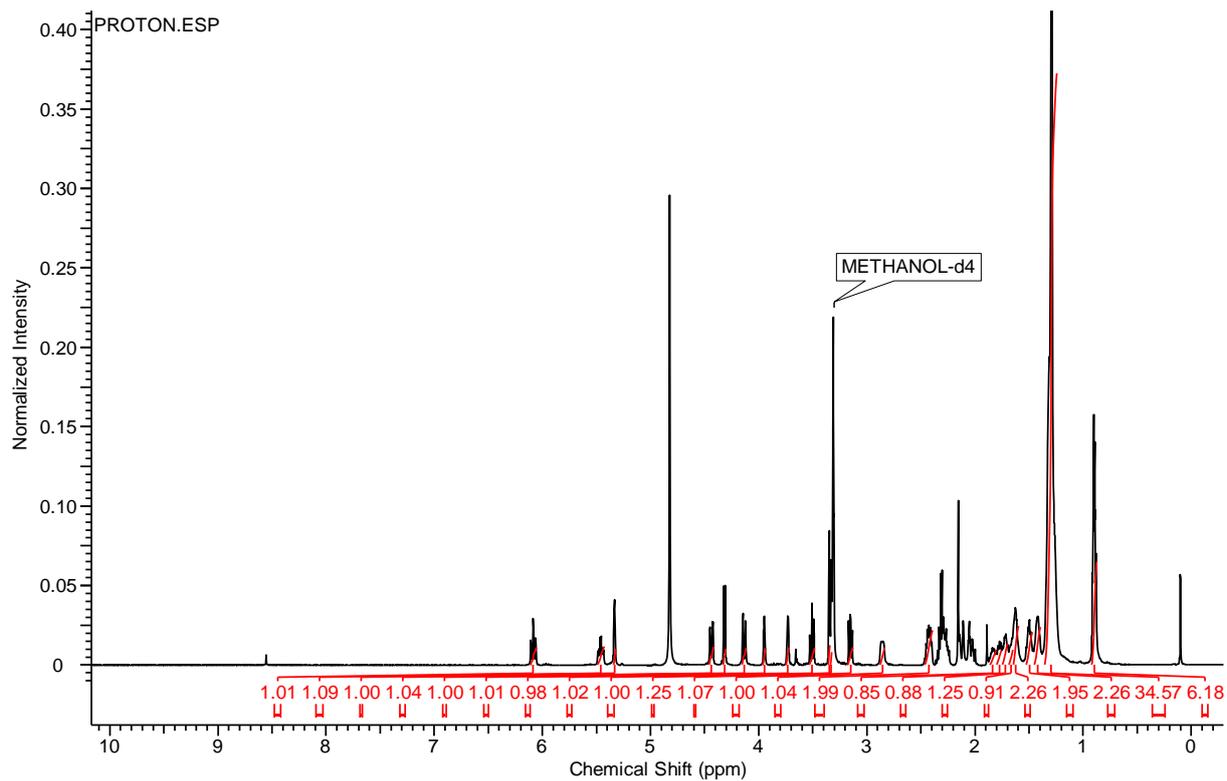
139.8 (C-5), 119.6 (C-6), 116.3 (C-7), 141.4 (C-8), 46.2 (C-9), 37.0 (C-10), 23.0 (C-11), 39.0 (C-12), 42.8 (C-13), 54.5 (C-14), 21.2 (C-15), 28.2 (C-16), 55.7 (C-17), 12.0 (C-18), 16.3 (C-19), 40.3 (C-20), 21.1 (C-21), 135.5 (C-22), 131.9 (C-23), 42.8 (C-24), 33.0 (C-25), 19.9 (C-26), 19.6 (C-27), 17.6 (C-28); **HRESITOFMS** m/z 395.3315 [M - H]⁻ (calcd for C₂₈H₄₃O, 395.6510).

1. Spectral data of 1.

Table S1. Full NMR data of compound **1**

1					
no.	δ_{H} , mult (J in Hz)	δ_{C}	COSY	HMBC	NOESY
1	4.32, d (7.6)	106.1	2	3, 5, 8	3, 5, 8
2	3.15, dd (9.4, 7.6)	75.5	1, 3	1, 3	4
3	3.329, br t (9.3)	77.5	2, 4	1, 2, 4, 6	1
4	3.51, br t (9.3)	70.6	3, 5	3, 5, 6	2, 6a
5	3.332, br dt (9.6, 2.0)	74.6	4, 6a, 6b	1, 2, 4, 6	1, 6a, 6b
6	a: 4.13, dd (11.7, 1.6) b: 4.44, dd (11.7, 2.5)	63.2	5, 6b 5, 6a	19 4, 5, 19	4, 5 5
7	5.33, br t (2.7)	76.0	8, 9eq, 12	8, 9, 11, 20	8, 12, 13, 16
8	3.73, br q (2.5)	77.3	7, 9ax, 9eq	1, 7, 10, 12	1, 7, 9ax, 9eq
9	ax: 2.04, dt (15.2, 3.8) eq: 2.12, br d (15.2)	34.5	8, 9eq, 10 7, 8, 9ax, 10	8, 10 7, 8, 10, 11	8, 10, 11 8, 10
10	3.95, br q (2.1)	70.1	9ax, 9eq, 11	8, 12	9ax, 9eq, 11, 36
11	1.71, m	38.6	10, 12, 36	12	9ax, 10, 12, 36
12	2.85, br d (10.1)	39.1	7, 11, 13	7, 10, 13	7, 11, 15b, 36
13	6.08, br t (10.7)	131.1	12, 14	11, 12, 15	7, 14, 36
14	5.46, br td (11.2, 5.2)	130.8	13, 15a, 15b	12, 15	13, 15a
15	a: 1.76, m b: 2.43, m	27.6	14, 15b, 16 14, 15a	14, 17 14, 17	14, 15b 12, 15a, 16, 18a
16	1.50, m	31.0	15a, 17b	14, 17	7, 15b
17	a: 1.64, m b: 1.84, m	26.5	17b, 18a 16, 17a	18, 19 18, 19	17b 17a
18	a: 2.27, ddd (13.8, 8.8, 5.2) b: 2.41, m	36.6	17a, 18b 18a	17, 19 17, 19	15b, 18b 18a
19		175.6			
20		174.0			
21	a: 2.29, dt (15.0, 7.3) b: 2.33, dt (15.0, 7.3)	35.6	21b 21a	20, 22	22
22	1.61, m	26.5		20	21b
23-34	1.21-1.35, m	23.8 to 33.3			
35/40	0.89/0.90, t (7.0)	14.6			
36	1.42, m	31.3			10, 11, 12, 13
37-39	1.21-1.35, m	23.8 to 33.3			

^aMeasured at 500MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C in methanol-*d*₄.



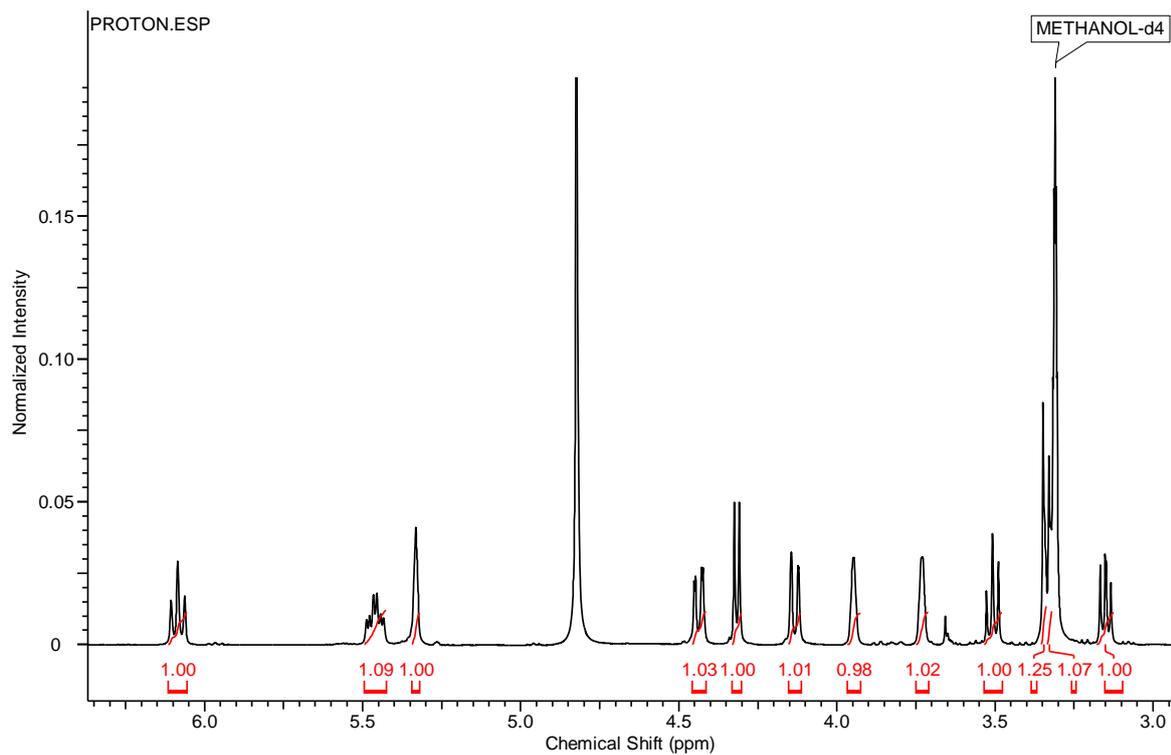


Figure S1. ^1H -NMR spectra of **1** in methanol- d_4 (500 MHz)

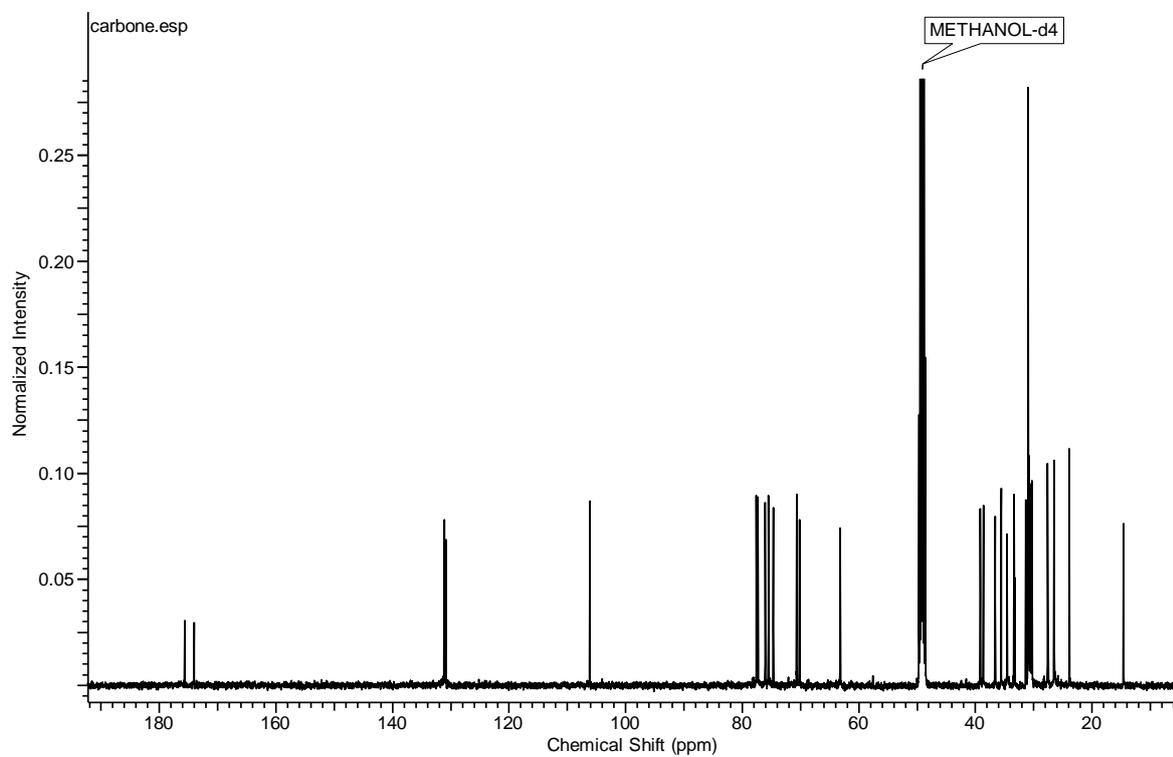


Figure S2. ^{13}C -NMR spectrum of **1** in methanol- d_4 (125 MHz)

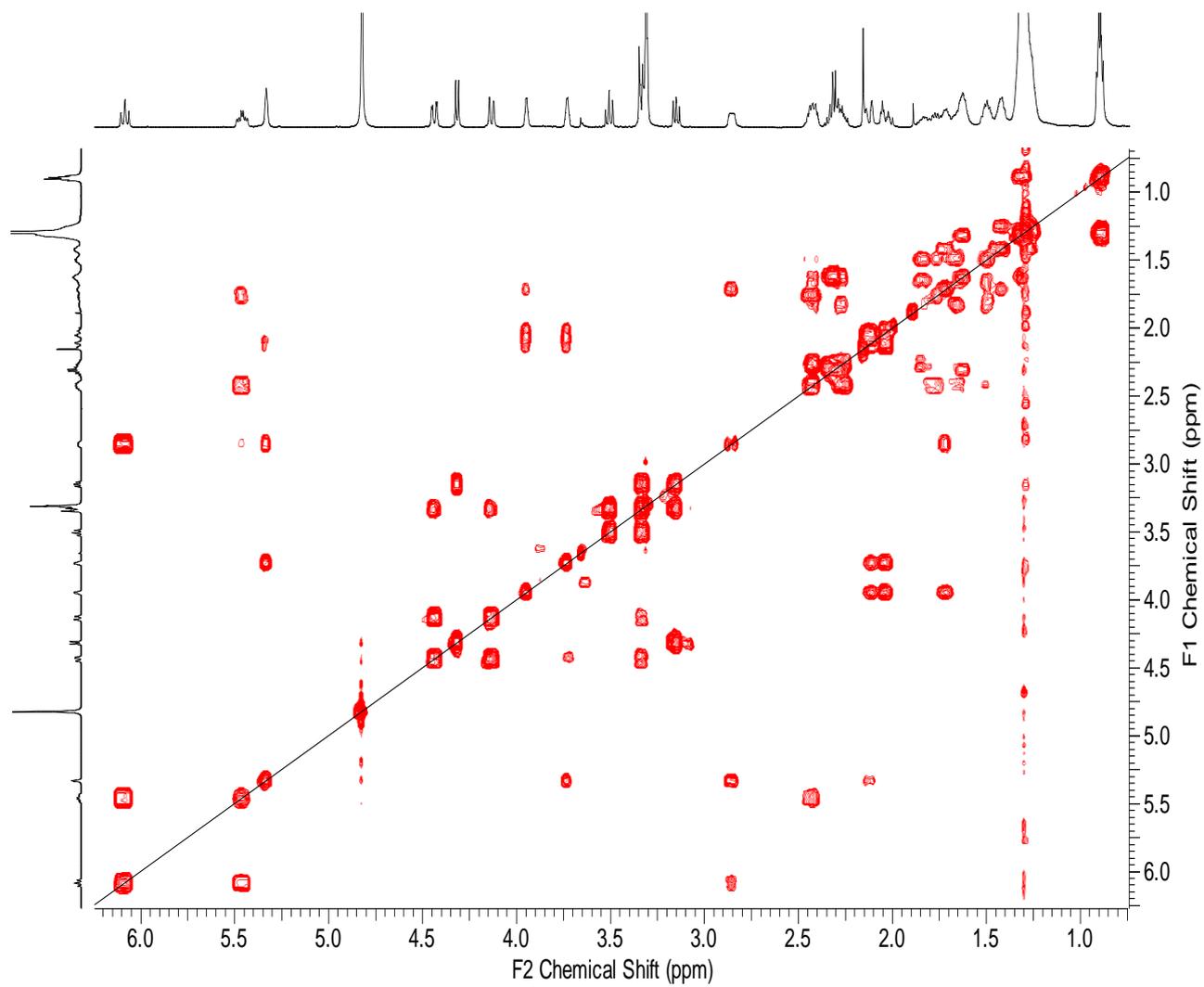


Figure S3. COSY spectrum of **1** in methanol- d_4 (500 MHz)

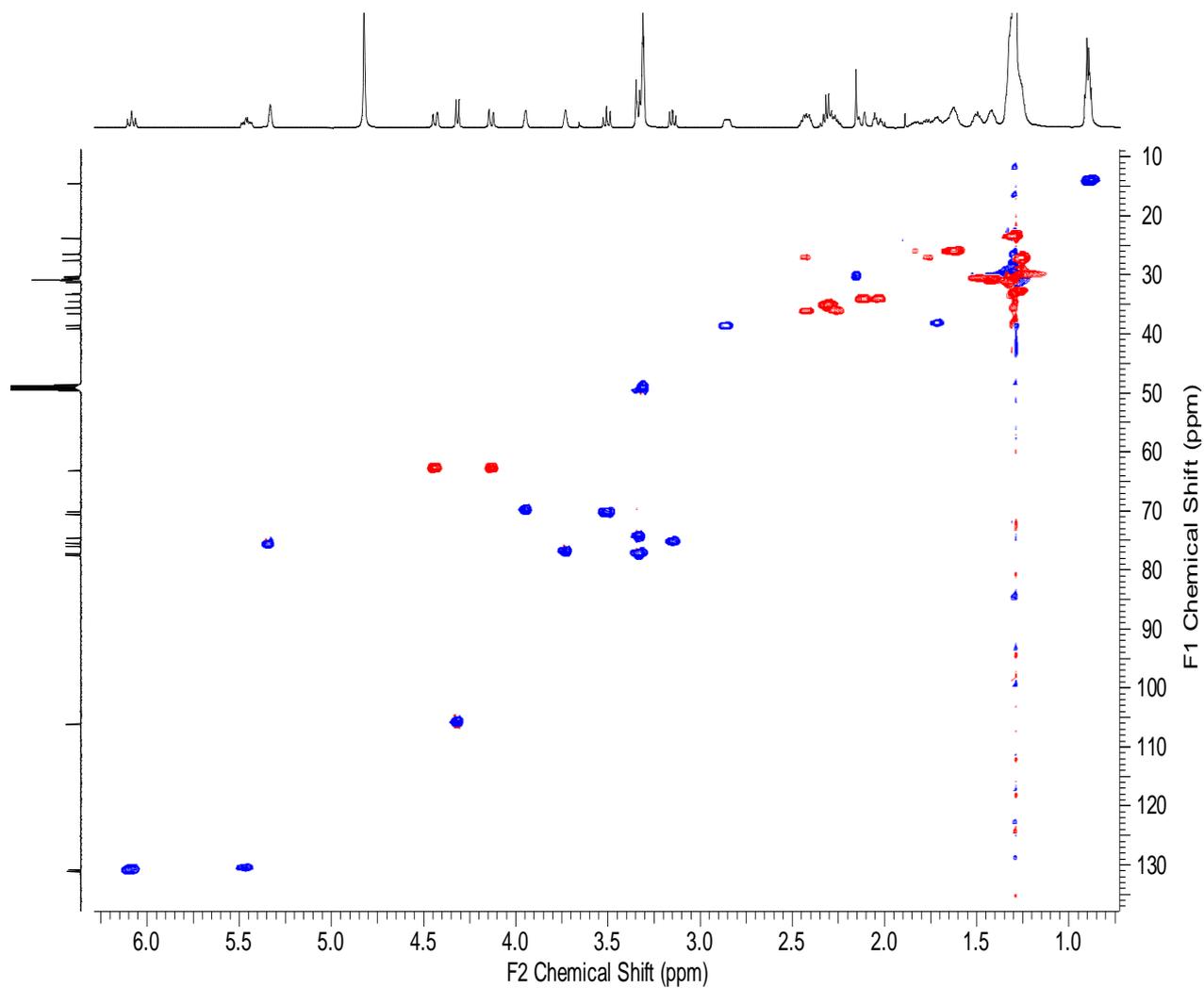
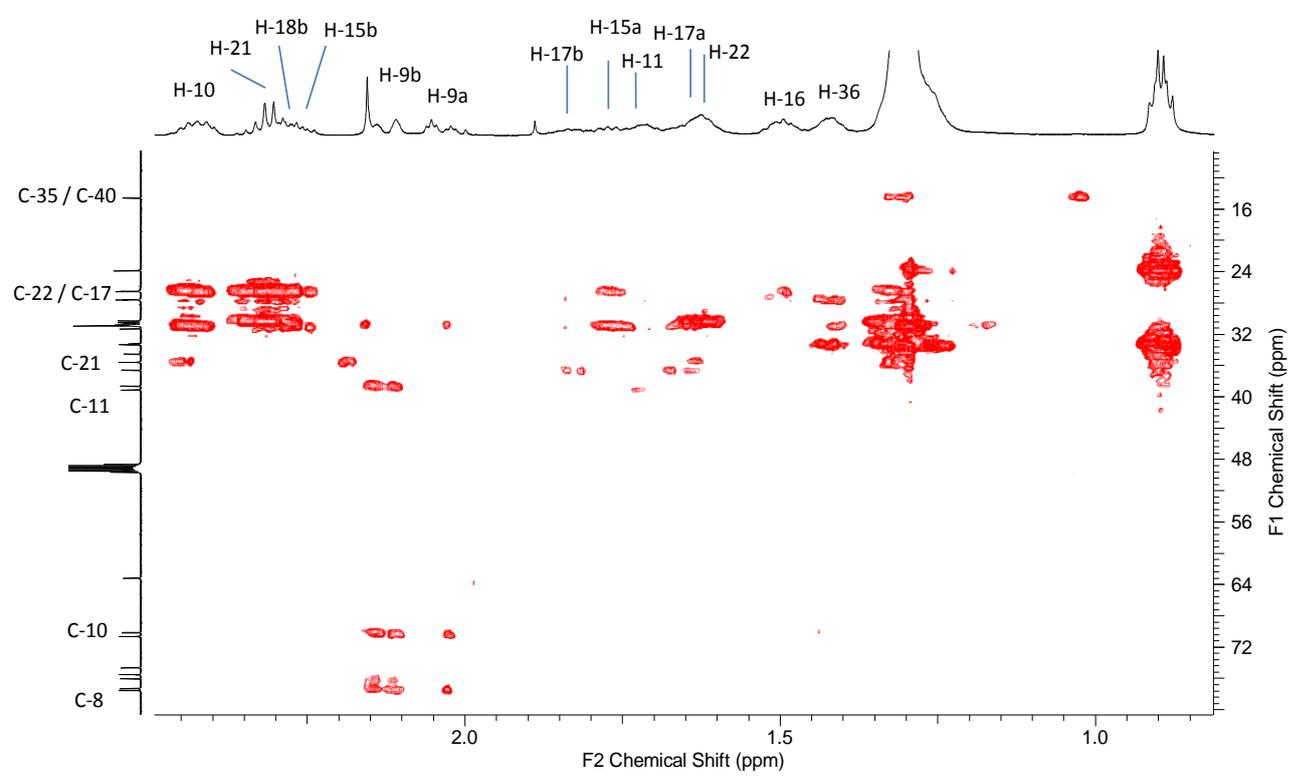
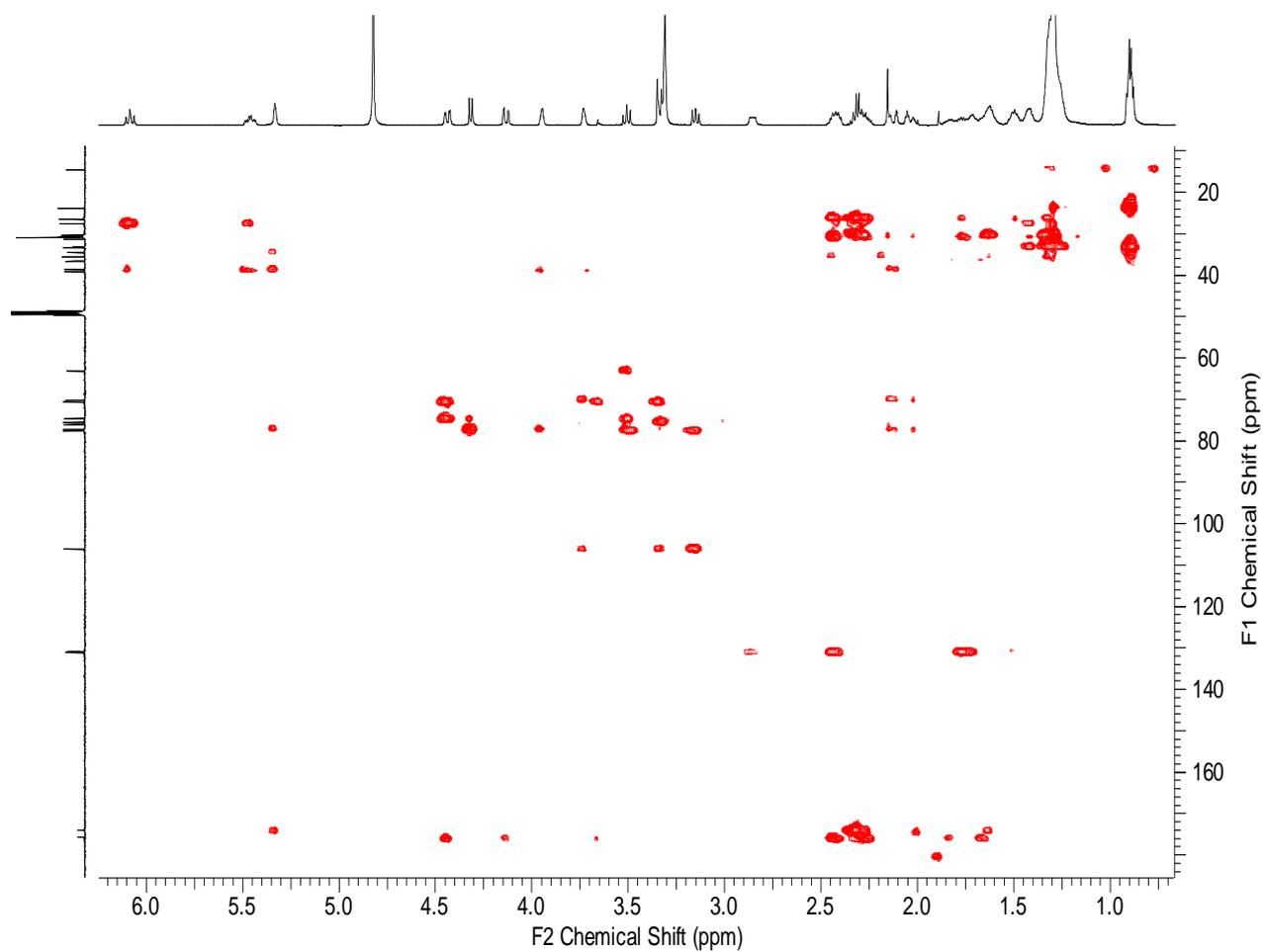


Figure S4. HSQC spectrum of **1** in methanol-*d*₄ (500 MHz)



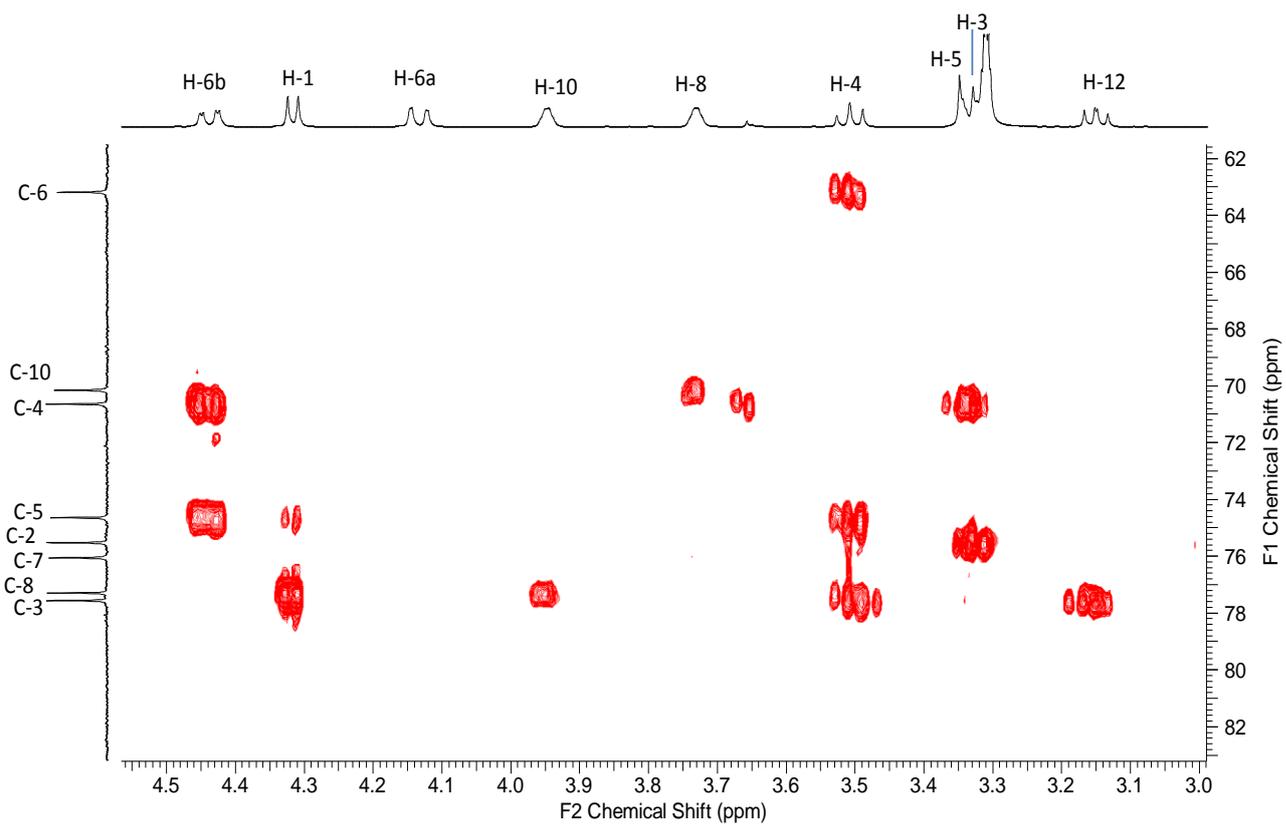


Figure S5. HMBC spectra of **1** in methanol-*d*₄ (500 MHz)

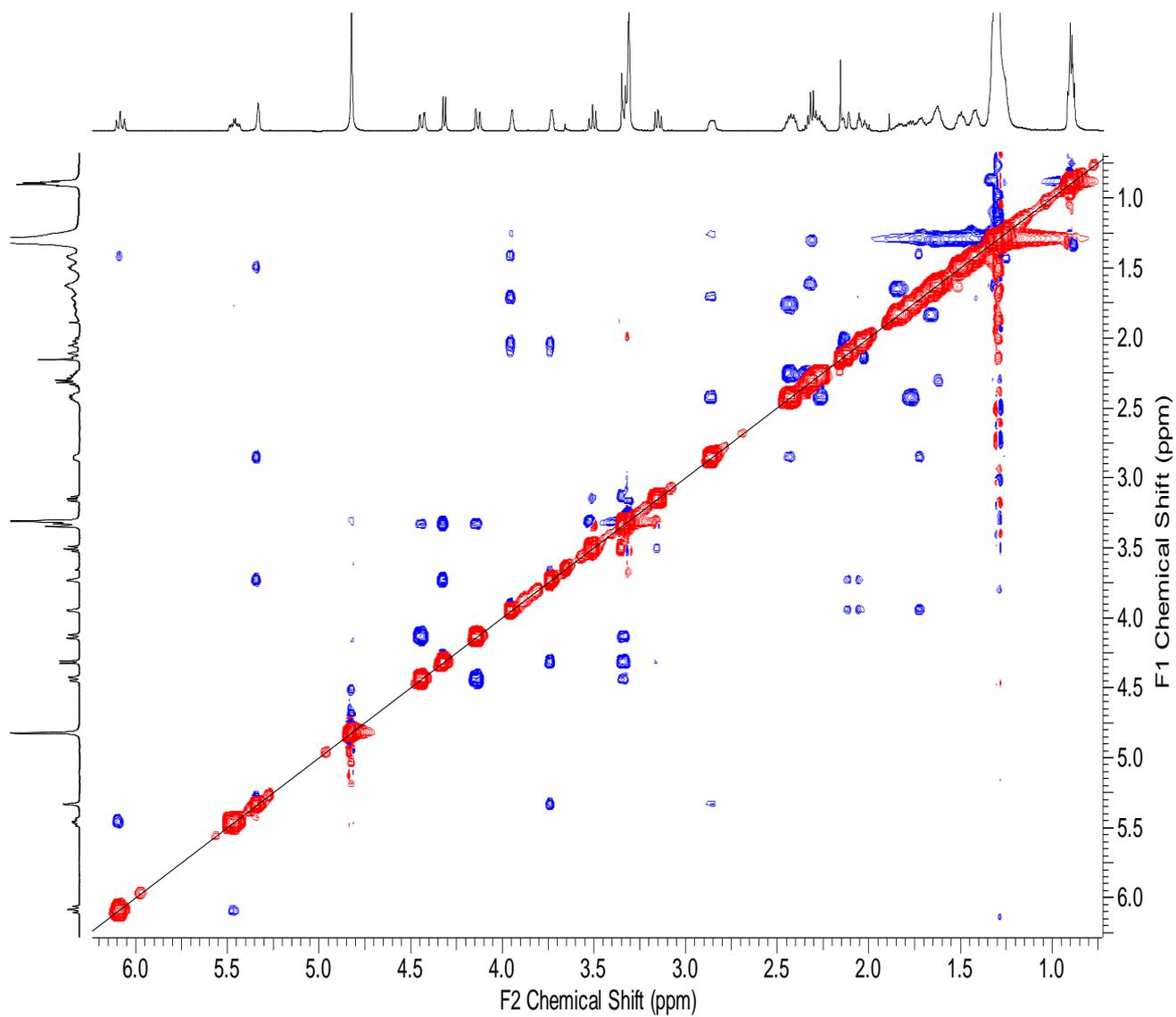


Figure S6. NOESY spectrum of **1** in methanol-*d*₄ (500 MHz)

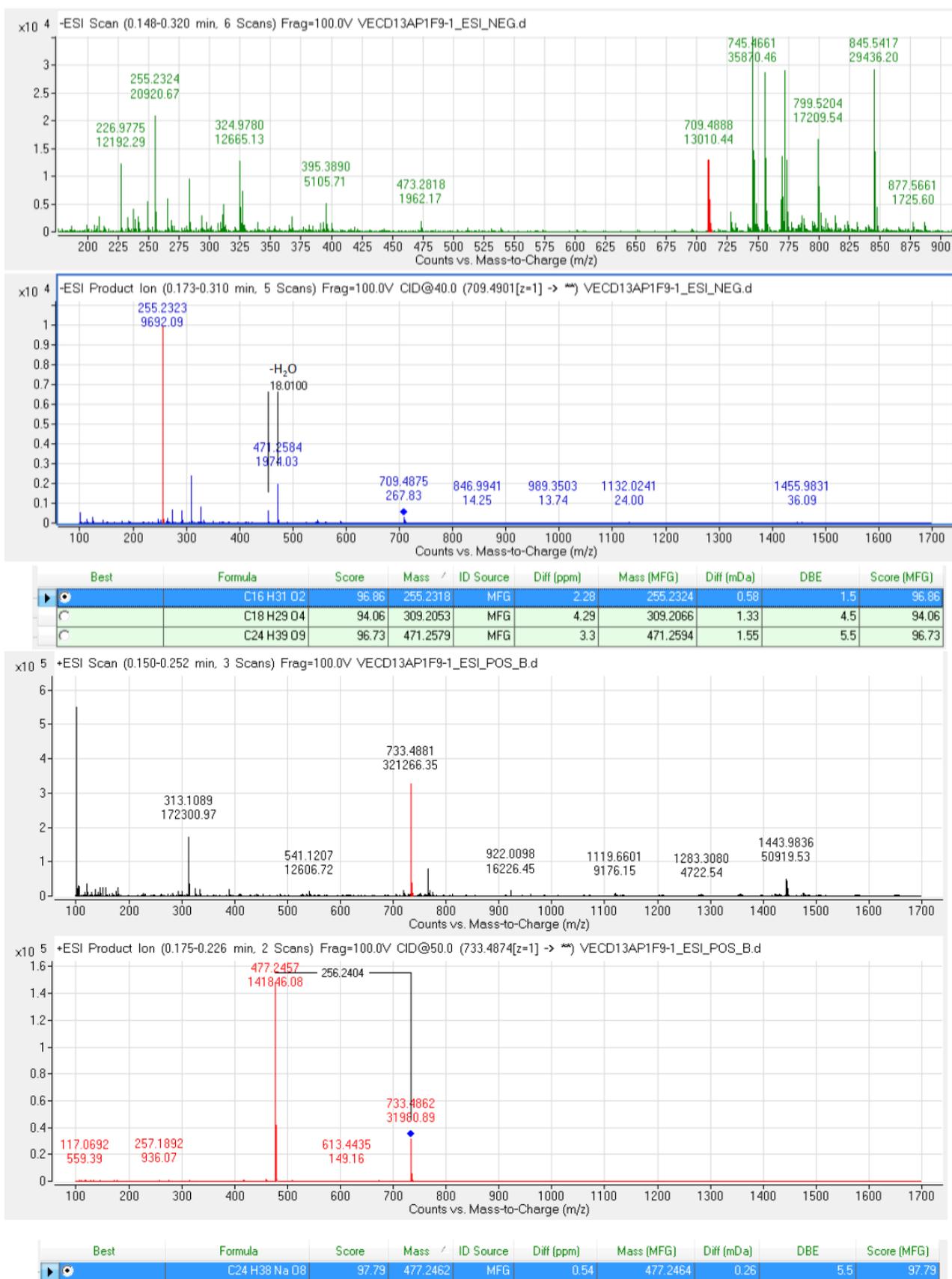
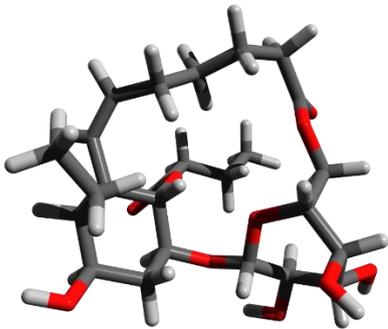
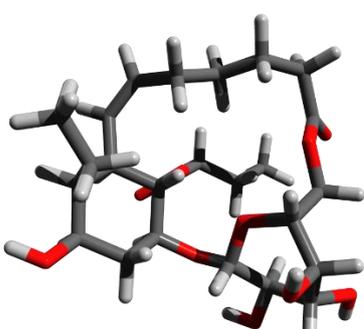


Figure S7. LC-MS² fragmentation of **1** (top : negative mode, bottom : positive mode)

Computational methods

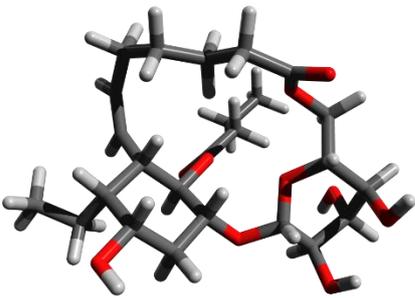
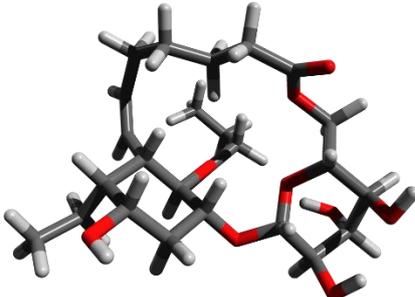
All DFT calculations have been performed using Gaussian09.¹ Due to the flexibility induced by the two aliphatic chains, the length has been reduced for the calculations. After a conformational analysis with the Marvin Suite (ChemAxon), 2 conformers of **1a** and 8 conformers of **1b** were obtained using a 1 kcal.mol⁻¹ threshold. After geometry optimization using the B3LYP method at the 6-31g(d) level and a frequency check at the same level of theory, GIAO NMR calculations were realized. After Boltzmann weighing of the predicted chemical shift of each diastereoisomers, the DP4 parameters were calculated using the Smith and Goodman Java source code.²

Table S2. Cartesian coordinates of the 1a conformers

							
C	5.40930	-4.94490	-4.43500	C	5.59700	-4.48270	-3.65200
C	6.23820	-5.98460	-5.19550	C	6.71590	-5.36480	-4.21340
C	7.20980	-6.73430	-4.28470	C	7.66720	-5.85690	-3.12100
C	7.61600	-5.86020	-3.08570	C	7.68800	-4.88340	-1.92790
O	6.49870	-5.55650	-2.26210	O	6.40900	-4.76650	-1.31170
C	5.25410	-5.28560	-2.94200	C	5.26520	-4.82300	-2.18970
H	10.05230	-6.74110	-1.04460	H	9.86810	-5.19630	0.52810
O	8.34610	-7.15440	-5.05830	O	8.97560	-6.05180	-3.68360
O	5.36680	-6.92740	-5.83350	O	6.14600	-6.50260	-4.87800
O	6.07030	-3.67060	-4.52890	O	6.03710	-3.11440	-3.71680
C	4.29270	-6.46490	-2.70830	C	4.56600	-6.18540	-2.03340
C	8.28230	-6.18990	0.04940	C	7.86810	-4.99690	1.29950
C	9.18670	-6.08910	-1.20500	C	8.92810	-4.74100	0.19740
C	9.75080	-4.68000	-1.37540	C	9.21910	-3.25000	0.03500
C	10.51330	-4.26270	-0.11830	C	9.65840	-2.64760	1.36930
C	9.62350	-4.27380	1.15320	C	8.58670	-2.80790	2.47970
C	9.02630	-5.70770	1.32730	C	8.26860	-4.32870	2.64590
H	11.35250	-4.95460	0.02910	H	10.58300	-3.14350	1.69140
O	7.71860	-7.51850	0.18490	O	7.57880	-6.41210	1.42950
C	8.51680	-8.60210	0.33890	C	8.54670	-7.28990	1.78850
O	9.73470	-8.58890	0.44800	O	9.69520	-7.00580	2.09790
O	3.79440	-6.36700	-1.35900	O	3.81610	-6.14980	-0.80130
C	3.39080	-7.52360	-0.77480	C	3.56210	-7.34600	-0.21120
C	2.82310	-7.27020	0.60600	C	2.72480	-7.17280	1.03860
C	3.56490	-6.19560	1.40120	C	3.08760	-5.94180	1.87000

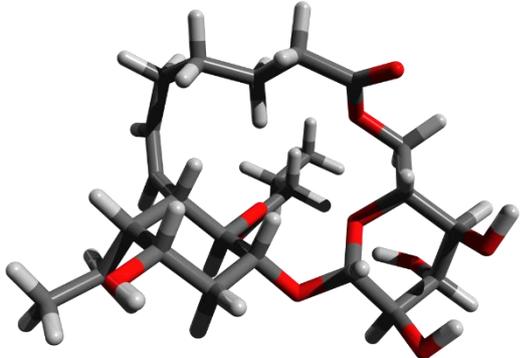
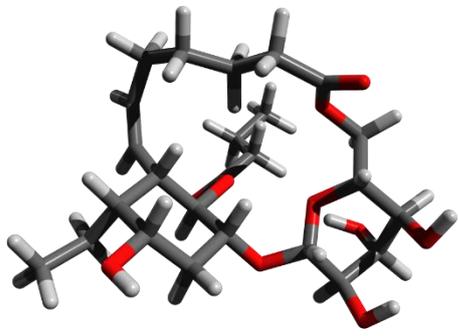
C	4.93230	-6.67770	1.89620	C	4.41790	-6.11140	2.61090
C	5.81870	-5.49570	2.29040	C	4.96480	-4.75840	3.06760
O	3.40260	-8.62450	-1.30940	O	3.89270	-8.43600	-0.65810
O	8.58950	-6.64140	-2.38320	O	8.65390	-5.43600	-1.02480
O	11.08490	-2.97700	-0.33790	O	9.98580	-1.27660	1.16470
C	8.33570	-5.93590	2.66060	C	7.41940	-4.65520	3.86250
H	8.09540	-4.94110	-3.43940	H	8.04320	-3.90110	-2.25740
C	7.04750	-5.91270	3.04180	C	6.10670	-4.88710	4.03040
H	6.70460	-12.21670	-0.70890	H	7.80570	-11.23580	0.67270
H	7.57520	-1.70490	2.39390	H	5.89240	-0.68080	3.21790
C	6.08970	-11.33050	-0.89460	C	7.01920	-10.53560	0.37390
C	6.94300	-10.07430	-0.93710	C	7.52760	-9.10380	0.39100
C	7.67790	-9.85400	0.38120	C	7.99780	-8.69440	1.78320
C	8.29850	-2.52160	2.48850	C	6.74400	-1.31930	3.47510
C	8.57430	-3.13150	1.11930	C	7.35090	-1.91070	2.20820
H	4.41910	-4.81960	-4.88900	H	4.69860	-4.55940	-4.27550
H	6.79140	-5.49260	-6.00530	H	7.27360	-4.81050	-4.97870
H	6.75230	-7.66300	-3.92310	H	7.36070	-6.85060	-2.77260
H	4.84840	-4.40440	-2.42860	H	4.59040	-4.04810	-1.80390
H	9.00400	-7.44730	-4.39410	H	9.56410	-6.17770	-2.91140
H	5.95170	-7.56530	-6.28880	H	6.90360	-6.99420	-5.25220
H	5.98470	-3.36590	-5.45090	H	5.29240	-2.54800	-3.44650
H	4.80420	-7.42060	-2.85400	H	5.29330	-7.00150	-2.00640
H	3.42710	-6.39990	-3.37520	H	3.84770	-6.34990	-2.84290
H	7.41670	-5.54680	-0.10740	H	6.92630	-4.56110	0.96750
H	8.95610	-3.95540	-1.59080	H	8.34280	-2.71300	-0.34760
H	10.41180	-4.64160	-2.25050	H	9.99690	-3.09740	-0.72410
H	10.29410	-4.07230	2.00100	H	9.04990	-2.44740	3.40960
H	9.90650	-6.36350	1.40820	H	9.23560	-4.78130	2.91110
H	2.83290	-8.21510	1.16120	H	2.82870	-8.07610	1.65040
H	1.77760	-6.97090	0.47050	H	1.67970	-7.10360	0.71610
H	2.95800	-5.91810	2.27220	H	2.29720	-5.77060	2.61120
H	3.67670	-5.28420	0.80250	H	3.11490	-5.04630	1.23840
H	5.42930	-7.25980	1.11530	H	5.14980	-6.59840	1.96050
H	4.78650	-7.35310	2.74850	H	4.26670	-6.77710	3.46990
H	6.06610	-4.90740	1.40500	H	5.23460	-4.15600	2.19840
H	5.25330	-4.81780	2.94300	H	4.17060	-4.19750	3.57750
H	11.57760	-2.73100	0.46410	H	10.29070	-0.91490	2.01500
H	9.04350	-6.21830	3.44480	H	8.02550	-4.76340	4.76640
H	6.84760	-6.17600	4.08230	H	5.79030	-5.15450	5.04060
H	5.33400	-11.26400	-0.10510	H	6.17180	-10.65830	1.05590
H	5.57220	-11.46910	-1.84890	H	6.68640	-10.80750	-0.63260
H	6.30150	-9.21500	-1.16510	H	6.72740	-8.43700	0.04940
H	7.66650	-10.14980	-1.75790	H	8.35000	-8.99800	-0.32660
H	8.34100	-10.70140	0.59010	H	8.79090	-9.36900	2.12660
H	6.97970	-9.77450	1.22230	H	7.18400	-8.75190	2.51480
H	9.21480	-2.10660	2.92070	H	7.47680	-0.70020	4.00280
H	7.88780	-3.24530	3.19340	H	6.38660	-2.08500	4.16480
H	7.63510	-3.46830	0.67290	H	6.58240	-2.45230	1.65120
H	8.92140	-2.30990	0.48240	H	7.62500	-1.05980	1.57430

Table S3. Cartesian coordinates of the 1b conformers

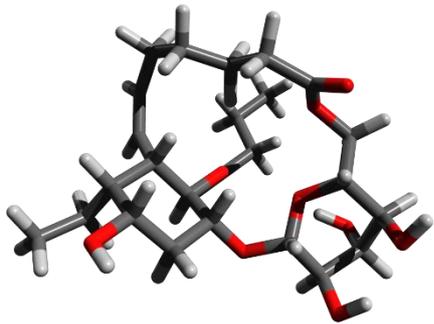
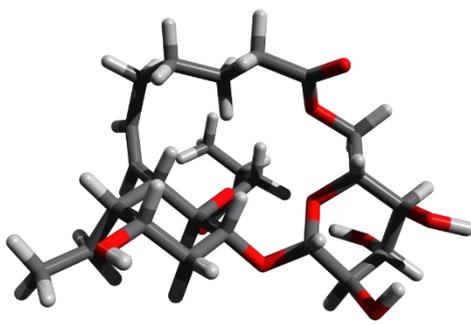
							
C	7.89090	-4.07190	-7.50990	C	7.88400	-4.08860	-7.49840
C	7.51820	-3.23730	-6.27470	C	7.55070	-3.19400	-6.28870
C	7.35130	-1.74850	-6.66770	C	7.47070	-1.71070	-6.73240
C	6.78250	-1.59380	-8.10230	C	6.77120	-1.59400	-8.11270
O	6.02810	-2.74600	-8.44380	O	5.99750	-2.76820	-8.34720
C	6.83040	-3.92110	-8.62260	C	6.81380	-3.92440	-8.59920
H	5.58010	-1.07430	-10.10500	H	5.49720	-1.11070	-10.06230
O	8.62980	-1.08900	-6.57590	O	8.79350	-1.14810	-6.80890
O	6.34060	-3.77660	-5.67010	O	6.33160	-3.63780	-5.68290
O	9.15600	-3.57390	-7.99370	O	9.15840	-3.66140	-8.01770
C	5.85770	-5.11370	-8.68150	C	5.85750	-5.12800	-8.68190
C	3.72490	-0.46110	-9.15490	C	3.66610	-0.46890	-9.09990
C	5.24270	-0.30160	-9.40020	C	5.18350	-0.32500	-9.36050
C	5.54010	1.06250	-10.01730	C	5.50430	1.02790	-9.99340
C	4.77820	1.23120	-11.33110	C	4.70870	1.22530	-11.28430
C	3.24580	1.07590	-11.15680	C	3.17850	1.10450	-11.06470
C	2.96100	-0.30930	-10.50040	C	2.90160	-0.30230	-10.44450
H	5.12380	0.46870	-12.04100	H	5.00970	0.44680	-11.99770
O	3.49640	-1.78750	-8.63490	O	3.42860	-1.79570	-8.57990
C	2.69820	-1.90870	-7.54190	C	2.53540	-1.91480	-7.56180
O	2.12060	-0.99260	-6.97430	O	1.94390	-0.99160	-7.02120
O	4.85350	-4.91080	-9.70370	O	4.85200	-4.91270	-9.69960
C	5.29050	-4.97120	-10.98440	C	5.29030	-4.96490	-10.98130
C	4.27630	-4.46810	-11.98990	C	4.27020	-4.47480	-11.98700
C	2.98170	-3.88860	-11.41330	C	2.98980	-3.86680	-11.40710
C	2.22840	-3.06500	-12.46360	C	2.24050	-3.04460	-12.46150
C	0.86130	-2.55900	-11.99630	C	0.86050	-2.55780	-12.01090
O	6.40750	-5.35920	-11.31190	O	6.41220	-5.33900	-11.30720
O	5.95910	-0.41580	-8.16060	O	5.91410	-0.44350	-8.12880
O	5.08010	2.49250	-11.91760	O	5.05040	2.46160	-11.89040
C	1.48900	-0.60720	-10.33300	C	1.43070	-0.62380	-10.30520
H	7.59240	-1.44850	-8.82950	H	7.51220	-1.46270	-8.91290
C	0.69000	-1.50660	-10.93160	C	0.65670	-1.52570	-10.93260
H	1.30940	-5.72230	-6.53150	H	-0.23440	-2.58340	-7.84850
H	0.91000	3.59380	-10.44000	H	1.92590	4.31870	-10.37250
C	1.53970	-5.08580	-5.67110	C	-0.10610	-3.60020	-7.46570
C	1.57930	-3.62020	-6.07210	C	1.07210	-3.68900	-6.50550
C	2.64690	-3.36100	-7.13060	C	2.40350	-3.37190	-7.18190

C	1.29680	2.73470	-10.99770	C	2.60690	3.63440	-10.89020
C	2.62490	2.28240	-10.39970	C	2.55160	2.26000	-10.23580
H	8.03580	-5.12500	-7.24400	H	7.98580	-5.13640	-7.19560
H	8.32510	-3.32170	-5.53630	H	8.34460	-3.29830	-5.53990
H	6.69220	-1.24590	-5.95080	H	6.92190	-1.12780	-5.98410
H	7.32970	-3.80890	-9.59130	H	7.29390	-3.76880	-9.57190
H	9.25550	-1.62590	-7.10470	H	9.34780	-1.80190	-7.28470
H	6.12360	-3.20930	-4.90730	H	5.59570	-3.21630	-6.16830
H	9.48030	-4.21350	-8.65680	H	9.46100	-4.34870	-8.64250
H	5.30920	-5.20700	-7.73910	H	6.39160	-6.06510	-8.87580
H	6.38090	-6.06090	-8.85670	H	5.31000	-5.24380	-7.74050
H	3.40940	0.29070	-8.42270	H	3.36200	0.28260	-8.36210
H	5.29560	1.87000	-9.31510	H	5.31540	1.84520	-9.28610
H	6.61910	1.16630	-10.19000	H	6.58050	1.09230	-10.20060
H	2.81860	1.07110	-12.17000	H	2.70220	1.14030	-12.05520
H	3.37720	-1.05990	-11.17540	H	3.32780	-1.03290	-11.13520
H	4.03400	-5.29740	-12.66360	H	4.01140	-5.31670	-12.63860
H	4.78720	-3.68920	-12.56900	H	4.78230	-3.71470	-12.58970
H	3.20230	-3.26250	-10.55000	H	3.22910	-3.23240	-10.55460
H	2.34940	-4.70840	-11.05080	H	2.34870	-4.67210	-11.02860
H	2.05850	-3.70890	-13.33700	H	2.08940	-3.68280	-13.34260
H	2.84100	-2.23370	-12.82750	H	2.84960	-2.20390	-12.80970
H	0.33240	-2.18420	-12.88300	H	0.34340	-2.17500	-12.90110
H	0.28780	-3.43610	-11.66570	H	0.29090	-3.44610	-11.70430
H	6.04700	2.57090	-11.98840	H	6.01830	2.50530	-11.97610
H	1.00700	0.00970	-9.56920	H	0.92450	-0.03300	-9.53670
H	-0.34910	-1.47410	-10.58860	H	-0.38810	-1.51520	-10.60570
H	2.50100	-5.40440	-5.25530	H	0.02930	-4.27420	-8.31760
H	0.76970	-5.25040	-4.91100	H	-1.03100	-3.88400	-6.95370
H	1.77560	-3.00800	-5.18380	H	1.11650	-4.70690	-6.10090
H	0.59550	-3.32010	-6.45250	H	0.90130	-3.01500	-5.65810
H	2.43160	-3.96480	-8.01950	H	2.51150	-3.99190	-8.07920
H	3.63280	-3.63640	-6.74260	H	3.22810	-3.60770	-6.50080
H	0.54070	1.94690	-10.96430	H	2.30360	3.58980	-11.94060
H	1.42470	3.04290	-12.04040	H	3.60500	4.07470	-10.82360
H	2.47490	2.05420	-9.34000	H	1.49030	2.04550	-10.07000
H	3.29580	3.14810	-10.42560	H	3.00980	2.32800	-9.24390

C	7.89120	-4.07910	-7.51190	C	7.88400	-4.07030	-7.50150
C	7.57900	-3.15310	-6.32040	C	7.56990	-3.11210	-6.33550
C	7.51300	-1.67960	-6.79710	C	7.53210	-1.64960	-6.84730
C	6.78090	-1.58060	-8.16160	C	6.81200	-1.57380	-8.21970
O	6.00670	-2.75960	-8.36840	O	6.02540	-2.74870	-8.40630
C	6.82030	-3.91930	-8.61240	C	6.82950	-3.92130	-8.61920
H	5.48120	-1.11090	-10.09550	H	5.52310	-1.14360	-10.16890
O	8.84320	-1.14320	-6.92210	O	8.87210	-1.13820	-6.97530
O	6.36010	-3.56810	-5.69430	O	6.33640	-3.49410	-5.71650
O	9.17080	-3.68650	-8.04540	O	9.17530	-3.70750	-8.02740
C	5.86100	-5.12110	-8.68520	C	5.86160	-5.11680	-8.68530
C	3.65650	-0.47210	-9.11780	C	3.70890	-0.43740	-9.22070
C	5.17140	-0.32340	-9.39380	C	5.22690	-0.32900	-9.49270
C	5.47950	1.02860	-10.03560	C	5.56710	0.99590	-10.17290
C	4.67270	1.21680	-11.32130	C	4.77180	1.15750	-11.46900
C	3.14480	1.08530	-11.09070	C	3.24020	1.07230	-11.24080
C	2.88180	-0.31830	-10.45780	C	2.93970	-0.30470	-10.56590
H	4.97410	0.43880	-12.03510	H	5.05690	0.34710	-12.15280
O	3.42960	-1.79720	-8.58740	O	3.45000	-1.74220	-8.65650
C	2.53220	-1.91750	-7.57200	C	2.57780	-1.80810	-7.61460
O	1.91800	-0.99800	-7.05130	O	2.01280	-0.85630	-7.09630
O	4.85320	-4.90620	-9.70040	O	4.85490	-4.90150	-9.70170
C	5.28900	-4.96930	-10.98260	C	5.28880	-4.97210	-10.98400
C	4.27480	-4.47000	-11.98930	C	4.27800	-4.46690	-11.99140
C	2.98230	-3.88350	-11.41430	C	2.97810	-3.89580	-11.41850
C	2.23170	-3.06180	-12.46860	C	2.21180	-3.09770	-12.47940
C	0.84910	-2.58070	-12.02040	C	0.84290	-2.59380	-12.01450
O	6.40720	-5.35490	-11.30800	O	6.40430	-5.36530	-11.30930
O	5.91690	-0.43450	-8.17000	O	5.96100	-0.41940	-8.26080
O	5.00170	2.45430	-11.93210	O	5.13390	2.36300	-12.12350
C	1.41380	-0.65080	-10.30960	C	1.46360	-0.59350	-10.40380
H	7.50320	-1.45470	-8.97960	H	7.54180	-1.47400	-9.03480
C	0.64220	-1.55600	-10.93540	C	0.66820	-1.50940	-10.98250
H	0.94480	-5.66270	-6.60000	H	0.88060	-5.41950	-6.36680
H	1.84030	4.28540	-10.44050	H	2.04880	4.33360	-10.66770
C	1.24980	-5.06610	-5.73450	C	1.37600	-4.85730	-5.56860
C	1.36880	-3.59630	-6.10150	C	1.54770	-3.39810	-5.95720
C	2.41020	-3.37520	-7.19460	C	2.39720	-3.25380	-7.21640
C	2.51820	3.60150	-10.96300	C	2.70710	3.61560	-11.16880
C	2.51670	2.24490	-10.26930	C	2.63880	2.27100	-10.45580
H	7.97540	-5.12160	-7.18560	H	7.94900	-5.10590	-7.15000
H	8.37880	-3.24970	-5.57660	H	8.35850	-3.20270	-5.57920
H	6.99610	-1.06930	-6.04810	H	7.01960	-1.01260	-6.11760
H	7.29960	-3.77270	-9.58690	H	7.32280	-3.79720	-9.58980
H	9.37660	-1.82420	-7.38420	H	9.39740	-1.83890	-7.41690
H	5.62500	-3.15400	-6.18730	H	5.61400	-3.08480	-6.23210
H	9.45840	-4.39230	-8.65660	H	9.46640	-4.43620	-8.60900
H	6.39220	-6.06040	-8.87690	H	6.38720	-6.06070	-8.87110
H	5.31710	-5.23230	-7.74130	H	5.31720	-5.21900	-7.74090
H	3.35490	0.28290	-8.38230	H	3.42110	0.34460	-8.50850

H	5.29190	1.84770	-9.32990	H	5.39070	1.84030	-9.49490
H	6.55350	1.09910	-10.25190	H	6.64360	1.03820	-10.38320
H	2.66210	1.10750	-12.07850	H	2.76100	1.07830	-12.23050
H	3.31000	-1.05030	-11.14530	H	3.34750	-1.06880	-11.23070
H	4.02980	-5.30360	-12.65670	H	4.04270	-5.29380	-12.67050
H	4.78700	-3.69600	-12.57390	H	4.78870	-3.68260	-12.56350
H	3.20620	-3.25440	-10.55350	H	3.19480	-3.25540	-10.56430
H	2.34790	-4.70010	-11.04870	H	2.35700	-4.71820	-11.04310
H	2.08570	-3.69860	-13.35170	H	2.04280	-3.75900	-13.34020
H	2.83740	-2.21780	-12.81420	H	2.81520	-2.26800	-12.86170
H	0.33360	-2.19340	-12.90950	H	0.30330	-2.25160	-12.90780
H	0.28040	-3.47210	-11.72140	H	0.28150	-3.46640	-11.65270
H	5.96890	2.50570	-12.02090	H	6.10170	2.38280	-12.21800
H	0.90840	-0.06600	-9.53610	H	0.97410	0.04030	-9.65910
H	-0.40070	-1.55500	-10.60240	H	-0.37330	-1.46560	-10.64720
H	2.20350	-5.45680	-5.36600	H	2.34470	-5.32610	-5.36810
H	0.50070	-5.20130	-4.94820	H	0.76470	-4.93990	-4.66460
H	1.63660	-3.02070	-5.20740	H	2.01480	-2.85400	-5.12760
H	0.39190	-3.22620	-6.43500	H	0.56090	-2.94690	-6.11570
H	2.12850	-3.93890	-8.09110	H	1.92090	-3.77900	-8.05190
H	3.38980	-3.72160	-6.84920	H	3.38680	-3.68840	-7.03950
H	2.17890	3.52010	-12.00020	H	2.38190	3.53170	-12.21020
H	3.50750	4.06520	-10.94580	H	3.71380	4.03990	-11.14060
H	1.46670	2.01170	-10.06340	H	1.57610	2.08040	-10.27210
H	3.00460	2.34840	-9.29470	H	3.10750	2.37350	-9.47180
							
C	7.88630	-4.11030	-7.48900	C	7.87030	-4.09780	-7.47950
C	7.57010	-3.20280	-6.28410	C	7.53570	-3.18450	-6.28420
C	7.50500	-1.72200	-6.73740	C	7.47800	-1.70600	-6.74700
C	6.78580	-1.60470	-8.10730	C	6.78250	-1.59700	-8.13010
O	6.00690	-2.77750	-8.33230	O	6.00250	-2.76920	-8.35740
C	6.81760	-3.93600	-8.58980	C	6.81440	-3.93220	-8.59380
H	5.51590	-1.10560	-10.05190	H	5.51310	-1.12960	-10.08510
O	8.83520	-1.18090	-6.84110	O	8.80920	-1.16450	-6.83030
O	6.34970	-3.62850	-5.66840	O	6.30530	-3.60660	-5.68540
O	9.16670	-3.70780	-8.01310	O	9.15580	-3.69490	-7.99000
C	5.85630	-5.13530	-8.67960	C	5.85310	-5.13150	-8.67970
C	3.68160	-0.47270	-9.09060	C	3.68950	-0.44460	-9.13870
C	5.20000	-0.32480	-9.34520	C	5.20970	-0.32780	-9.39670
C	5.52260	1.03240	-9.96710	C	5.55430	1.00930	-10.05040

C	4.73400	1.23420	-11.26120	C	4.76640	1.19740	-11.34760
C	3.20280	1.11670	-11.04690	C	3.23370	1.10580	-11.13110
C	2.91960	-0.29290	-10.43560	C	2.93150	-0.28620	-10.48840
H	5.03580	0.45690	-11.97550	H	5.05640	0.40210	-12.04700
O	3.45160	-1.80760	-8.58850	O	3.43620	-1.76120	-8.59880
C	2.53050	-1.95720	-7.60030	C	2.51750	-1.86160	-7.60170
O	1.89660	-1.05460	-7.07360	O	1.90910	-0.92940	-7.09630
O	4.85290	-4.91300	-9.69790	O	4.85160	-4.91480	-9.70020
C	5.29130	-4.96090	-10.97980	C	5.29210	-4.96190	-10.98140
C	4.26750	-4.47700	-11.98520	C	4.26830	-4.47740	-11.98580
C	2.99250	-3.85790	-11.40520	C	2.99500	-3.85980	-11.40090
C	2.24720	-3.03160	-12.45880	C	2.23310	-3.05390	-12.45830
C	0.86950	-2.53870	-12.00830	C	0.85990	-2.55840	-11.99720
O	6.41440	-5.33100	-11.30650	O	6.41570	-5.33090	-11.30690
O	5.92900	-0.45340	-8.11310	O	5.93300	-0.44090	-8.15980
O	5.08160	2.47080	-11.86320	O	5.13100	2.41710	-11.97380
C	1.44690	-0.60870	-10.30000	C	1.45510	-0.58120	-10.34910
H	7.51660	-1.47500	-8.91720	H	7.52680	-1.47710	-8.92900
C	0.66970	-1.50700	-10.92890	C	0.67000	-1.49020	-10.95220
H	1.03680	-5.82180	-7.17700	H	0.94240	-5.68780	-7.12710
H	1.96190	4.33180	-10.33940	H	2.02910	4.35090	-10.49810
C	0.97510	-5.22560	-6.26080	C	0.84570	-5.06090	-6.23480
C	1.09620	-3.74220	-6.56800	C	1.01040	-3.59010	-6.58060
C	2.42820	-3.41940	-7.23680	C	2.37860	-3.30950	-7.19450
C	2.63390	3.64510	-10.86550	C	2.69460	3.64590	-11.00800
C	2.57880	2.26980	-10.21320	C	2.62500	2.28630	-10.32430
H	7.97110	-5.15750	-7.17860	H	7.95370	-5.14320	-7.16240
H	8.36760	-3.31060	-5.53960	H	8.32080	-3.28880	-5.52630
H	6.97890	-1.12470	-5.98440	H	6.93820	-1.10530	-6.00660
H	7.29930	-3.77800	-9.56120	H	7.30650	-3.78550	-9.56170
H	9.37310	-1.85080	-7.31400	H	9.35420	-1.83490	-7.29380
H	5.61550	-3.20380	-6.15360	H	5.57870	-3.19220	-6.19070
H	9.45870	-4.40610	-8.63060	H	9.45370	-4.39190	-8.60620
H	6.38740	-6.07370	-8.87700	H	6.38420	-6.07120	-8.87010
H	5.30680	-5.25260	-7.73940	H	5.30180	-5.24340	-7.74020
H	3.37200	0.26630	-8.34220	H	3.39400	0.32040	-8.41100
H	5.32790	1.84530	-9.25620	H	5.37600	1.84140	-9.35780
H	6.59960	1.10060	-10.16760	H	6.63190	1.05380	-10.25490
H	2.72970	1.16000	-12.03850	H	2.76110	1.13270	-12.12360
H	3.34300	-1.02060	-11.13100	H	3.34710	-1.03410	-11.16680
H	4.00130	-5.32510	-12.62570	H	4.00180	-5.32410	-12.62780
H	4.77940	-3.72590	-12.59950	H	4.77860	-3.72470	-12.59880
H	3.23850	-3.22390	-10.55490	H	3.24570	-3.21310	-10.56110
H	2.34570	-4.65750	-11.02400	H	2.35780	-4.65850	-11.00190
H	2.09300	-3.66880	-13.33990	H	2.06910	-3.70790	-13.32560
H	2.86020	-2.19370	-12.80640	H	2.83820	-2.22010	-12.82940
H	0.35420	-2.15270	-12.89830	H	0.32550	-2.20760	-12.89040
H	0.29590	-3.42500	-11.70280	H	0.29940	-3.43770	-11.65050
H	6.04950	2.50840	-11.95070	H	6.09920	2.43840	-12.06480
H	0.94160	-0.01760	-9.53110	H	0.95370	0.03880	-9.60070

H	-0.37520	-1.49260	-10.60230	H	-0.37530	-1.45470	-10.62850
H	1.77100	-5.55180	-5.58370	H	1.59930	-5.37900	-5.50750
H	0.01360	-5.43660	-5.78250	H	-0.14310	-5.23950	-5.80090
H	0.99450	-3.17010	-5.63840	H	0.87470	-2.98790	-5.67430
H	0.26820	-3.43770	-7.21950	H	0.21980	-3.29090	-7.27940
H	2.52020	-4.01430	-8.15260	H	2.50640	-3.93760	-8.08350
H	3.26360	-3.66550	-6.57300	H	3.17890	-3.54300	-6.48450
H	2.31860	3.60310	-11.91240	H	2.37990	3.58430	-12.05400
H	3.63470	4.08040	-10.80980	H	3.69940	4.07240	-10.96080
H	1.51770	2.05650	-10.04540	H	1.56190	2.08990	-10.14980
H	3.03900	2.33440	-9.22190	H	3.08810	2.36870	-9.33580
							
C	7.87190	-4.07620	-7.48970	C	7.84050	-4.07910	-7.42770
C	7.54690	-3.12210	-6.32300	C	7.50460	-3.11640	-6.27240
C	7.51320	-1.65770	-6.83050	C	7.47030	-1.65420	-6.78690
C	6.80990	-1.57810	-8.21120	C	6.77540	-1.57900	-8.17210
O	6.02030	-2.75060	-8.40510	O	6.00080	-2.75830	-8.36970
C	6.82430	-3.92480	-8.61410	C	6.82140	-3.92120	-8.57920
H	5.52130	-1.16010	-10.16250	H	5.50450	-1.16830	-10.13520
O	8.85290	-1.14240	-6.93910	O	8.81220	-1.14060	-6.88330
O	6.30690	-3.50630	-5.71790	O	6.26400	-3.50070	-5.67230
O	9.16660	-3.71120	-8.00540	O	9.14970	-3.74130	-7.92100
C	5.85620	-5.11930	-8.68350	C	5.86000	-5.11960	-8.68290
C	3.71930	-0.40900	-9.22980	C	3.67880	-0.46240	-9.21070
C	5.23900	-0.33060	-9.49870	C	5.19910	-0.34910	-9.46870
C	5.60350	0.97720	-10.19850	C	5.54430	0.96960	-10.15700
C	4.81590	1.13000	-11.50080	C	4.76160	1.11750	-11.46220
C	3.28180	1.06770	-11.27980	C	3.22790	1.03240	-11.24840
C	2.96050	-0.29340	-10.58170	C	2.92120	-0.33770	-10.56350
H	5.09370	0.30600	-12.17110	H	5.05430	0.30140	-12.13590
O	3.44150	-1.69580	-8.63390	O	3.42650	-1.76860	-8.64500
C	2.58860	-1.71800	-7.57750	C	2.52020	-1.84920	-7.63570
O	2.02530	-0.74820	-7.08900	O	1.92830	-0.90550	-7.13200
O	4.85330	-4.90670	-9.70300	O	4.86010	-4.88840	-9.70260
C	5.29070	-4.96940	-10.98410	C	5.29130	-4.97080	-10.98450
C	4.27520	-4.47070	-11.98940	C	4.28160	-4.46390	-11.99240
C	2.98460	-3.88470	-11.40960	C	2.97220	-3.91080	-11.42430
C	2.21760	-3.09120	-12.47330	C	2.20390	-3.11780	-12.48780
C	0.85100	-2.58270	-12.00850	C	0.83120	-2.62300	-12.02630
O	6.40930	-5.35390	-11.30910	O	6.40080	-5.37710	-11.31220

O	5.96700	-0.41800	-8.26330	O	5.92110	-0.42800	-8.22820
O	5.19800	2.32070	-12.17040	O	5.12970	2.31810	-12.12240
C	1.48090	-0.56300	-10.42540	C	1.44270	-0.62140	-10.41470
H	7.54890	-1.48320	-9.01810	H	7.51890	-1.47490	-8.97390
C	0.68030	-1.47910	-10.99680	C	0.64950	-1.53460	-11.00050
H	1.47660	-5.73380	-7.45400	H	-0.23150	-2.53060	-8.01940
H	2.12250	4.35180	-10.77120	H	2.00720	4.29080	-10.73600
C	0.77800	-5.05090	-6.95990	C	-0.11870	-3.53530	-7.60120
C	0.99560	-3.62070	-7.42410	C	1.01390	-3.59140	-6.58560
C	2.39890	-3.13200	-7.09200	C	2.37480	-3.29250	-7.20950
C	2.76970	3.61650	-11.26150	C	2.66740	3.56740	-11.22670
C	2.69200	2.28800	-10.51960	C	2.61880	2.23890	-10.48260
H	7.93510	-5.11300	-7.14140	H	7.87330	-5.12040	-7.08800
H	8.32780	-3.21500	-5.55900	H	8.28040	-3.20200	-5.50240
H	6.98920	-1.02440	-6.10600	H	6.94150	-1.02080	-6.06570
H	7.32330	-3.80100	-9.58160	H	7.33910	-3.78610	-9.53590
H	9.38520	-1.83880	-7.37880	H	9.30810	-1.75400	-7.46290
H	5.58870	-3.11000	-6.24950	H	5.54810	-3.13550	-6.22930
H	9.45570	-4.43070	-8.59960	H	9.79500	-4.18770	-7.33880
H	6.38180	-6.06410	-8.86430	H	6.39230	-6.05750	-8.87970
H	5.30780	-5.21770	-7.74100	H	5.30550	-5.24120	-7.74610
H	3.44030	0.39470	-8.53850	H	3.37920	0.31860	-8.50210
H	5.43780	1.83580	-9.53570	H	5.36100	1.82020	-9.48870
H	6.68160	0.99820	-10.40470	H	6.62290	1.01120	-10.35710
H	2.80790	1.06160	-12.27210	H	2.75920	1.02730	-12.24330
H	3.36480	-1.07340	-11.22930	H	3.33430	-1.10650	-11.21880
H	4.02900	-5.30340	-12.65750	H	4.05740	-5.28650	-12.68050
H	4.78510	-3.69610	-12.57510	H	4.78840	-3.67030	-12.55480
H	3.21090	-3.23950	-10.56070	H	3.17570	-3.27210	-10.56580
H	2.36000	-4.69990	-11.02400	H	2.35770	-4.74130	-11.05620
H	2.04510	-3.75870	-13.32860	H	2.04140	-3.78080	-13.34860
H	2.82210	-2.26610	-12.86370	H	2.80260	-2.28390	-12.86880
H	0.30480	-2.25950	-12.90500	H	0.28850	-2.29040	-12.92140
H	0.29430	-3.44950	-11.62600	H	0.27750	-3.49750	-11.65820
H	6.16730	2.33010	-12.25180	H	6.09750	2.32970	-12.21990
H	0.99290	0.08690	-9.69380	H	0.94770	0.01500	-9.67590
H	-0.36290	-1.41960	-10.67010	H	-0.39490	-1.48700	-10.67520
H	0.91760	-5.13810	-5.87760	H	0.05730	-4.23310	-8.42620
H	-0.23990	-5.37540	-7.19790	H	-1.06560	-3.80750	-7.12440
H	0.25080	-2.96860	-6.95230	H	1.04080	-4.59590	-6.14670
H	0.82530	-3.56040	-8.50550	H	0.80330	-2.89080	-5.76960
H	3.15080	-3.78430	-7.54990	H	2.52740	-3.94530	-8.07670
H	2.58520	-3.14650	-6.01220	H	3.16790	-3.50060	-6.48350
H	2.43580	3.51530	-12.29850	H	2.33150	3.45590	-12.26200
H	3.78080	4.03100	-11.24920	H	3.67020	4.00130	-11.22060
H	1.62850	2.11010	-10.32830	H	1.55970	2.04220	-10.28580
H	3.16410	2.40790	-9.53920	H	3.09350	2.36620	-9.50440

Références

¹ Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.

² Smith, S. G.; Goodman, J. M. Assigning Stereochemistry to Single Diastereoisomers by GIAO NMR Calculation: The DP4 Probability. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 12946–12959. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja105035r>.

Résultats complémentaires :

Plusieurs résultats n'ont pas été incorporés à la publication et sont détaillés dans ce paragraphe. Tout d'abord, la structure plane de la mucorolactone a été déterminée à l'aide de la RMN 1D et 2D et de la HRMS. Néanmoins pour déterminer la configuration relative et absolue de cette molécule nous avons tenté plusieurs méthodes présentées ci-dessous. Nous aborderons aussi les résultats des essais biologiques obtenus pour les molécules isolées qui n'ont pas été décrites dans l'article présenté.

❖ Essais d'obtention de la configuration absolue de la mucorolactone

- par cristallisation

La molécule ayant été isolée sous forme solide, nous avons tout d'abord tenté de la cristalliser en utilisant plusieurs combinaisons de solvants, l'un solubilisant bien la molécule et l'autre comme contre-solvant (solubilisant peu ou pas la molécule) : Méthanol – eau / Acétonitrile – Eau / Méthanol – Heptane.

Les manipulations ont été effectuées à température ambiante et à 8°C. Aucun monocristal n'a pu être obtenu.

- par dérivatisation

Pour augmenter la masse de la molécule et augmenter les chances de la recristalliser nous avons fait réagir la mucorolactone avec le chlorure de *p*-bromobenzoyl en présence de pyridine (1) ou dans le dichlorométhane anhydre en présence de triéthylamine (2) (**Figure 42**). Plusieurs tentatives ont été menées, également en ajoutant de la DMAP (4-diméthylaminopyridine) au milieu réactionnel.

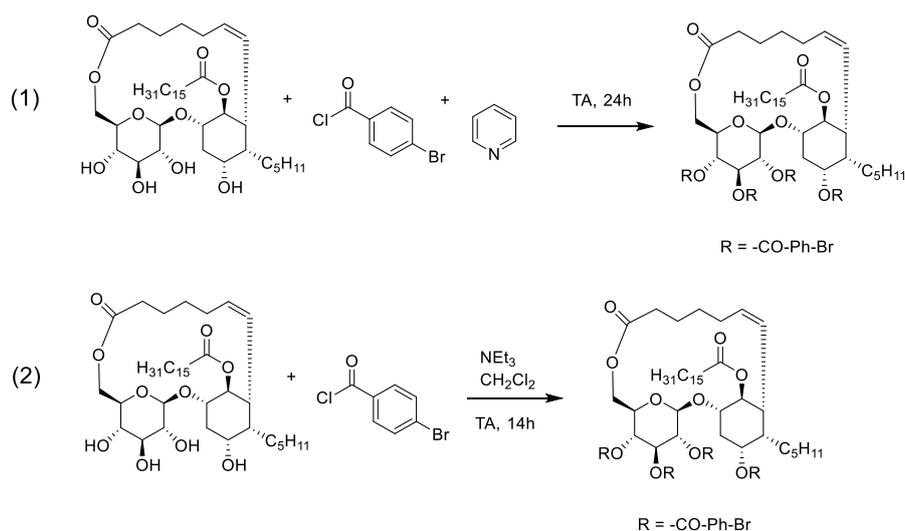


Figure 42: Réactions de dérivatisation réalisées sur la mucorolactone

Malheureusement, il semble que le nombre de sites réactifs ait été trop important et que le taux de conversion n'ait jamais été optimal, induisant ainsi la formation d'un mélange complexe de composés difficiles à séparer.

- par obtention des esters de Mosher

Nous avons fait réagir la mucorolactone avec les chlorures d'acide (*S*) et (*R*)-MTPA pour afin d'obtenir les esters (*R*) et (*S*)-MTPA de notre composé (**Figure 43**).

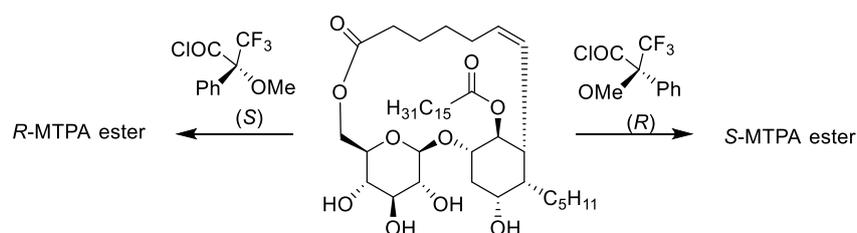


Figure 43: Processus de synthèse des esters de Mosher pour la mucorolactone

Plusieurs tentatives ont été réalisées, et nous avons pu constater, là encore, par observation des spectres de RMN ^1H que la réaction n'était pas totale du fait des nombreux hydroxyles et de l'important encombrement stérique.

- Hydrolyse des esters

D'autres réactions ont été réalisées dans le but d'hydrolyser les fonctions esters présentes dans la molécule afin de libérer la chaîne carbonée en position C-7 et tenter de

cristalliser la molécule par la suite. Cette technique devait également conduire à l'ouverture du macrocycle en C-19 et donc augmenter la flexibilité de la molécule à ce niveau.

Ainsi deux protocoles ont été utilisés : la première réaction a engagé la mucorolactone avec de l'hydroxyde de lithium (LiOH). La seconde réaction a engagé la mucuroolactone, avec de l'aluminohydrure de lithium (LiAlH₄).

Les produits d'hydrolyse ou de réduction n'ont pas pu être isolés des milieux réactionnels.

- par utilisation de MOFs

Nous avons tenté d'utiliser cette méthode de cristallographie utilisant l'éponge cristalline en collaboration avec Pascal Retailleau, du service de cristallographie de l'ICSN. Cette méthode est utilisée pour déterminer la configuration absolue de molécules organiques difficiles ou impossibles à cristalliser en utilisant des MOFs (Metal Organic Frameworks). Dans cette étude cristallographique, un cristal poreux est « trempé » dans une solution contenant la molécule à piéger. Celle-ci est absorbée et orientée dans les pores cristallins. La configuration absolue est ensuite déterminée par diffraction des rayons X.^{218,219}

Bien que nous ayons obtenu de nombreux cristaux, cette technique n'a pas permis d'inclure correctement les molécules testées. Des critères importants sont à prendre en compte dans la réalisation des manipulations. Une grande qualité de cristal doit être obtenue, il ne doit être ni trop fin ni trop long et permettre l'inclusion des molécules visées. Un autre critère important est la qualité de la solution de molécule, la présence d'impureté pouvant interférer et/ou empêcher l'inclusion de la molécule visée. Enfin il a été rapporté que de meilleurs résultats étaient obtenus pour des molécules ayant un caractère hydrophobe, et étant plutôt rigide. S'agissant de la mucorolactone on peut se demander si sa masse importante (710 g/mol) et la présence des deux chaînes carbonées flexibles n'ont pas empêché l'inclusion de la molécule.

Toutefois cette technique s'avère être une alternative intéressante et prometteuse pour la caractérisation de molécule organique. Pour pallier au problème de taille, nous

²¹⁸ Ramadhar TR, Zheng SL, et al. Analysis of rapidly synthesized guest-filled porous complexes with synchrotron radiation: practical guidelines for the crystalline sponge method. *Acta Cryst.* 2015; A71:46–58.

²¹⁹ Inokuma Y, Yoshikoka S, et al. Preparation and guest-uptake protocol for a porous complex useful for 'crystal-free' crystallography. *Nature Prot.* 2014; 9:245–252.

pourrions tenter la réalisation de nouvelles éponges présentant des mailles plus importantes.

Bien que de nombreuses tentatives aient été réalisées, aucune des stratégies abordées dans ce paragraphe n'a permis d'aboutir à la configuration relative et absolue de la mucorolactone. Nous avons toutefois pu obtenir la configuration relative par la technique de « probabilité du DP4 » réalisée avec la collaboration de Grégory Genta-Jouve (Université Paris Descartes). Cette technique se base sur des calculs de déplacements chimiques théoriques des carbones des différents diastéréoisomères possibles d'un composé, et les compare aux données expérimentales afin d'observer la meilleure correspondance. La publication de Goodman expose en détail les différents paramètres, conditions et algorithmes à prendre en compte pour l'élaboration des calculs de probabilités.²²⁰ Si la configuration absolue n'a pas été formellement démontrée, il est vraisemblable que la sous unité glucose soit de configuration D.

❖ Résultats des essais biologiques pour les molécules isolées

L'ensemble des composés isolés ont été testés comme insecticides et antimicrobiens. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 5** suivant :

Tableau 5 : Résultats des activités biologiques pour les composés isolés de la souche SNB-VECD13A

	Activité larvicide 10 ppm (%)	MIC (µg/mL)			
		<i>S. aureus</i>	SARM	<i>C. albicans</i>	<i>T. rubrum</i>
Mucorolactone (1)	10.0		>256	>256	>256
Acide déhydroabiétique (2)	50.0	128	64	>256	64
Cyclo(L-Pro-L-Phe) (3)	4.3	>256	>256	>256	>256
N-Acétyle tryptophane (4)	42.0			>256	
Daidzèine (5)	5.9	>256	>256		>256
2-(4-Hydroxyphenyl)éthyl acétate (6)	24.0	>256	>256	>256	>256
Acide phénylacétique (7)	24.0	>256	64	>256	>256
Ergostérol-5 α ,8 α -peroxyde (8)	54.0		64		64
Ergosta-5,7,22-triénol (9)	0	>256	>256		>256
^a Ctrl. positif		0.2	0.6	4	4

^a Contrôles positifs : oxacilline pour *S. aureus* ; fluconazole pour *C. albicans* et *T. rubrum* ; vancomycine pour SARM.

²²⁰ Smith SG, Goodman JM. Assigning stereochemistry to single diastereoisomers by GIAO NMR calculation: the DP4 probability. *JACS*. 2010; 132:12946–12959.

Les molécules isolées présentent des activités larvicides sur *Ae. Aegypti* modérées avoisinant les 50% de mortalité pour les plus actives : l'acide déhydroabiétique et l'ergostérol-5 α ,8 α -peroxyde (essais menés à 10 ppm). Ces activités pourraient expliquer les activités observées pour les fractions, qui elles ont été testées à 100 ppm.

Les activités antimicrobiennes, bien que faibles, ne sont observés que pour l'acide déhydroabiétique et l'ergostérol-5 α ,8 α -péroxyde. Ces deux composés ont été isolés respectivement des fractions VII et VIII respectivement. Ce sont les seules fractions présentant des activités antimicrobiennes. Ces molécules pourraient donc être responsables de ces activités.

4 Etude chimique de l'extrait de *Isaria* *farinosa* SNB-CLL10038

Le champignon *Isaria farinosa*

Classification

Division : Ascomycota

Classe : Sordariomycetes

Ordre : Hypocreales

Famille : Cordycipitaceae

Genre : *Isaria*



Isaria farinosa, également connu sous le nom de *Paecilomyces farinosus* est un champignon pathogène d'insectes fréquemment retrouvé dans les sols.

La taxonomie de cette souche a été sujette à controverse. Autrefois classée dans les genres *Spicaria* ou encore *Coremom*, la souche est aujourd'hui reconnue comme *Isaria farinosa* ou *Paecilomyces farinosus*.²²¹

L'écologie d'*I. farinosa* n'est pas bien établie. Trois idées subsistent :

- ce champignon pourrait être saprophyte et attaquer les insectes de manière opportuniste du fait de son abondance dans les litières de forêt et la vaste gamme d'enzymes hydrolytiques qu'il est capable de produire. De plus il présente une capacité à décomposer la litière et à vivre en compétition avec d'autres champignons des sols.²²¹
- Il pourrait être entomopathogène, car il dispose de chitinases et de protéases nécessaires à la destruction de la cuticule des insectes, sans être saprophyte.
- Et enfin la dernière hypothèse serait la possibilité que deux populations distinctes puissent coexister. Ce dernier avis serait appuyé par le fait que de nombreuses souches aient été isolées sur différents hôtes présentant des caractéristiques morphologiques, physiologiques et génétiques différentes.²²¹

Isaria farinosa est un champignon présentant une distribution étendue à travers le monde. Cette souche a précédemment été isolée de plusieurs insectes (principalement

²²¹ Harney SK. Thèse. Ecological and physiological aspects of *Paecilomyces farinosus*. University Montreal, Quebec, Canada. 1989.

des lépidoptères) et retrouvée dans des milieux variés tels que les sols, plantes, ou les eaux.²²²

L'étude de souches d'*I. farinosa* a montré que cette espèce produisait de nombreux métabolites (Figure 44). En effet, Cheng et son équipe ont isolé plusieurs farinosones dont certaines induisent la croissance de neurites chez les lignées cellulaires PC-12.²²³

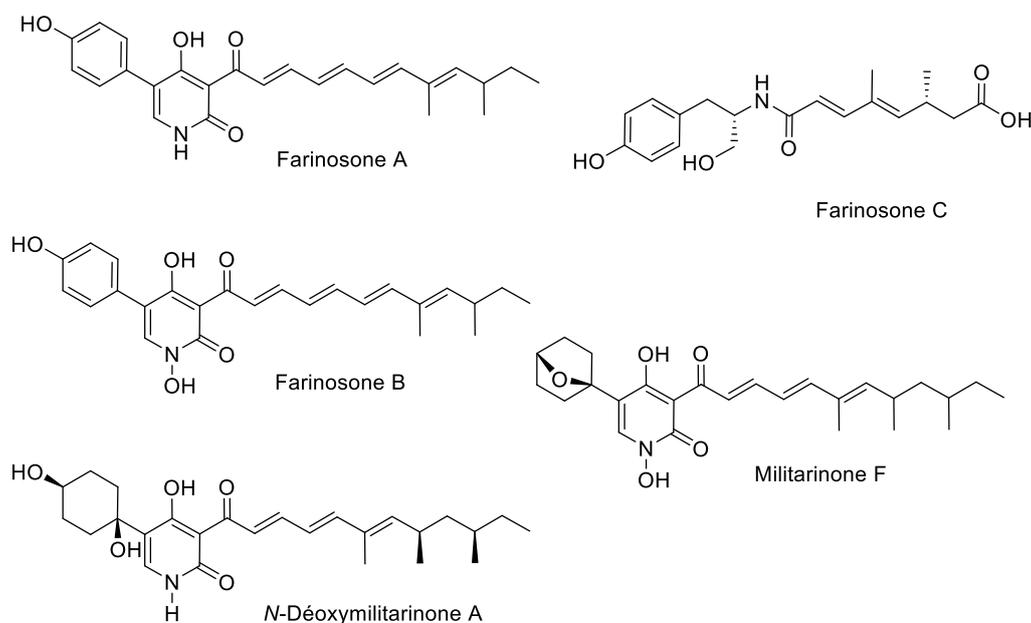


Figure 44: Molécules isolées du champignon *Isaria farinosa*

D'autres molécules présentant un cycle hydroxypyridinone ont également été isolées. Il s'agit de la *N*-déoxymilitarinone A ainsi et de la militarinone F.²²⁴²²⁵ Un autre composé, la paécilosétine, dérivé de l'acide tétramique, a également été isolé. Elle présente une activité antibactérienne sur *B. subtilis* et une activité antifongique sur *T. mentagrophytes*

²²² Zimmermann G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocont Sci Tech.* 2008; 18:865–901.

²²³ Cheng Y, Schneider B, et al. Farinosones A-C, neurotrophic alkaloidal metabolites from the entomogenous Deuteromycete *Paecilomyces farinosus*. *J Nat Prod.* 2004; 67:1854–1858.

²²⁴ Cheng Y, Schneider B, et al. (+)N-Deoxymilitarinone A, a neuritogenic pyridone alkaloid from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces farinosus*. *J Nat Prod.* 2006; 69:436–438.

²²⁵ Cheng M, Li Y, et al. N-Hydroxypyridones, Phenylhydrazones, and a Quinazolinone from *Isaria farinosa*. *J Nat Prod.* 2011; 74:32–37.

et *C. resinae*.²²⁶ Cette molécule inhibe également la croissance des phytopathogènes *Phytophthora sojae* et *Aphanomyces cochlicoides*.²²⁷

²²⁶ Lang G, Blunt JW, et al. Paecilosetin, a new bioactive fungal metabolite from a New Zealand isolate of *Paecilomyces farinosus*. *J Nat Prod*. 2005; 68:810–811.

²²⁷ Putri SP, Ishido K, et al. Production of antioomycete compounds active against the phytopathogens *Phytophthora sojae* and *Aphanomyces cochlioides* by clavicipitoid entomopathogenic fungi. *J Biosci Bioeng*. 2014; 117:557–562.

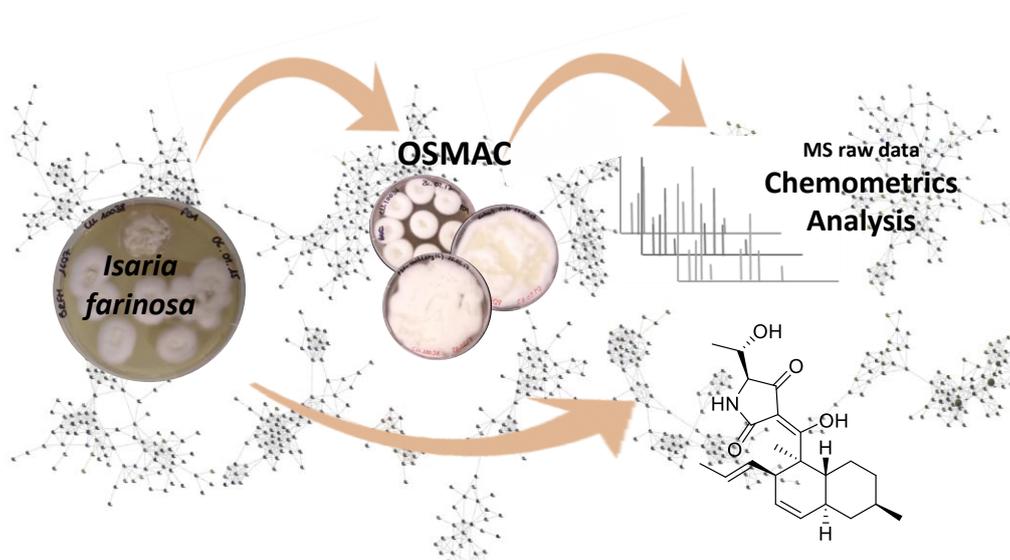
4.1 Article 3: OSMAC and metabolomics-based approaches for the targeted isolation of antimicrobial tetramic acids derivatives from *Isaria farinosa* SNB-CLL10038

Ce troisième article détaille les résultats de l'étude de l'extrait du champignon *Isaria farinosa* qui présentait respectivement des CMI de 32, 64 et 32 µg/mL, sur SARM, *C. albicans* et *T. rubrum* lors du criblage initial.

Dans le but d'explorer les capacités métaboliques de la souche, une méthode OSMAC a été mise en place et chaque extrait a été analysé par UHPLC-MSMS. Le traitement des données de masse, couplé à des analyses statistiques nous ont permis de cibler et isoler les composés responsables de l'activité.

Parmi ces composés nous avons identifié la paécilosétine, présentant une activité antimicrobienne, ainsi que quatre nouveaux analogues de cette molécule.

Cet article est destiné au Journal of Natural Products.



OSMAC and metabolomics-based approaches for the targeted isolation of antimicrobial tetramic acids derivatives from *Isaria farinosa* SNB-CLL10038

Seindé Touré,^{*,†,‡} Orianne Brel,^{†,‡} Christian Lechat,[‡] Isabelle Dusfour,[§] Didier Stien,[‡]
Véronique Eparvier^{*,†}

[†] CNRS – Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR2301, Université Paris-Saclay
91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

[‡] ASCOFrance, Villiers-en-bois, France

[§] Institut Pasteur de la Guyane, Unité de Contrôle et Adaptation des Vecteurs, BP6010,
97306 Cayenne, France

[‡] Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et
Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-
sur-Mer, France

ABSTRACT

In order to explore the chemical diversity of *Isaria farinosa* SNB-CLL10038 strain, a One Strain Many Compounds approach was undertaken by cultivation of fungus on different culture media. Metabolic induction was monitored by LC-MSMS and an Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis (OPLS-DA) model was constructed to highlight putative ion peaks responsible for the antimicrobial activities observed in extracts. The model fitted on antibacterial activity gave good predictability and pointed out compounds **1**, **2**, and **5** as being the most active ones. Paecilosetin (**1**), along with four new analogues named Paecilosetins B–E (**2–5**) and farinosone B (**6**) were isolated. The structures were elucidated by MS and NMR spectroscopic analyses, and absolute configurations were obtained using CD and conversion of compound **1** into its Mosher ester. Compounds **1** and **6** exhibited antibacterial activity on *S. aureus* and SARM with MIC 2–4 µg/mL.

INTRODUCTION

Natural products (NP) are a historical source of valuable bioactive compounds. Microbes largely contribute to the chemodiversity of natural products owing to their diversity and ubiquitous occurrence.^{1,2,3} Besides they have the advantage of being a renewable source of NPs as they can be cultured in the laboratory and cultures can be scaled up as required. However the resulting complex mixtures remained difficult to explore. Time-consuming purifications and rediscovery of known compound is a recurring problem. Also, it has been established that microbial chemical diversity is often largely underestimated under standard culture conditions.^{4,5,6} In general, it is possible to optimize metabolite production or to increase chemical diversity by playing with culture conditions.^{7,8,9} Small changes in culture conditions or co-cultivation with other microbial species (as OSMAC method) may activate cryptic biosynthetic pathway.^{10,11,12}

As part of our research on antimicrobials, we screened a collection of 57 microorganisms isolated from alive infected insect cuticle on several pathogenic microorganisms (*Staphylococcus aureus*, MRSA, *Candida albicans* and *Tricophyton rubrum*). As a result *Isaria farinosa* SNB-CLL10038 ethyl acetate extract exhibited interesting antimicrobial activities. The strain was thus selected for further investigations. Fungi belonging to the genus *Isaria* are known to be insect pathogens, mainly infecting Homoptera, Lepidoptera and Coleoptera.¹³ They have been the source of a wide array of metabolites of different chemical classes and diverse biological activities. Among them, antimicrobial compounds such as hydroxypyridinone and tetramic acid derivatives,^{14,15} cytotoxic cyclodepsipeptides cycloaspeptide C, F and G,¹⁶ and the antioxidant pseudo-dipeptide hanasanagin have been discovered from *Isaria* spp.¹⁷

The fungal strain was cultivated on seven different culture media. Coarse fractionation, metabolomic profiling of all extracts and fractions and multivariate analysis based on biological activities allowed us to target natural product isolation towards putative active secondary metabolites.

RESULTS AND DISCUSSION

First, we sought to observe the effect of the culture media on the production of active secondary metabolites by our strain of *Isaria farinosa*. Therefore, the fungus was cultivated on seven different media: potato dextrose agar (PDA), yeast extract (3g/L and 10g/L), malt extract, Czapeck-Dox medium, and PDA with NaCl (3g/L and 10g/L). The whole culture was then extracted with ethyl acetate according to standardized method used previously in our group.¹⁸ Also the PDA extract was prepared on larger scale and was coarsely fractionated on flash chromatography to generate 8 fractions.

The metabolic profiles of each extracts and fractions were recorded by UHPLC-HRMS. As observed on the chromatograms displayed in Figure S1, the extract profiles were somewhat different depending on culture medium. Subsequently, chromatographic data were processed and subjected to chemometric analyses.

Data were extracted and aligned through the GNPS platform. Raw data from GNPS were downloaded and standardized to be imported into SIMCA software for multivariate statistical analysis. PCA was first used to investigate the entire metabolic variation for each extract and provide trends and grouping. Analyses were performed by removing minor compounds and ions peaks from culture medium. A clear grouping trend was established between malt extract, PDA with yeast (3 g/L) firstly, media added with NaCl secondly and last group was occupied by PDA, Czapeck and PDA with yeast (10 g/L) as shown in Figure 1A. These observations indicate that culture media tuned fungus metabolism and cultures on the first group of media deviated significantly from PDA standard medium.

As the focus of the study was to identify antimicrobial metabolites, extracts and fractions were screened on human pathogens *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans* to record Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) (Table 3). The culture media added with NaCl salt or yeast autolysate at 3 g/L showed better activities on most pathogens. Extract obtained from malt medium culture displayed the strongest MICs against MRSA, *C. albicans* and *T. rubrum* (8, 16 and 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively).

OPLS models were constructed to investigate ions contribution to the antimicrobial activities. The first model was fitted according to antibacterial activity (Figure 1B). An R^2 value close to 1 ($R^2 = 0.999$) and Q^2 value larger than 0.5 ($Q^2 = 0.789$) was indicative of a good model with good predictability. OPLS point out the most significant ions regarding bioactivity. We focused on the first four ions, and metabolites identities given in Table 1 are based on HRMS data, retention time, and targeted isolation and structural determination described hereafter. Overall, the OPLS analysis unambiguously pointed out 2 pairs of isomers, each pair clustered as one compound by the GNPS. Compound at retention time 10.06 min was too minor and could not be isolated. Compound at t_{R} 9.00 min was also too minor and was not isolated. It is possible that OPLS analysis detected this metabolite because it eluted in between the presumably active ones.

No OPLS-DA model could be fitted for antifungal activity indicating an unclear correlation between extract composition and antifungal activity. At the very least, this result indicates that the antifungal activity is more diffuse in the extract and may not be associated to the same secondary metabolites as the antibacterial activity.

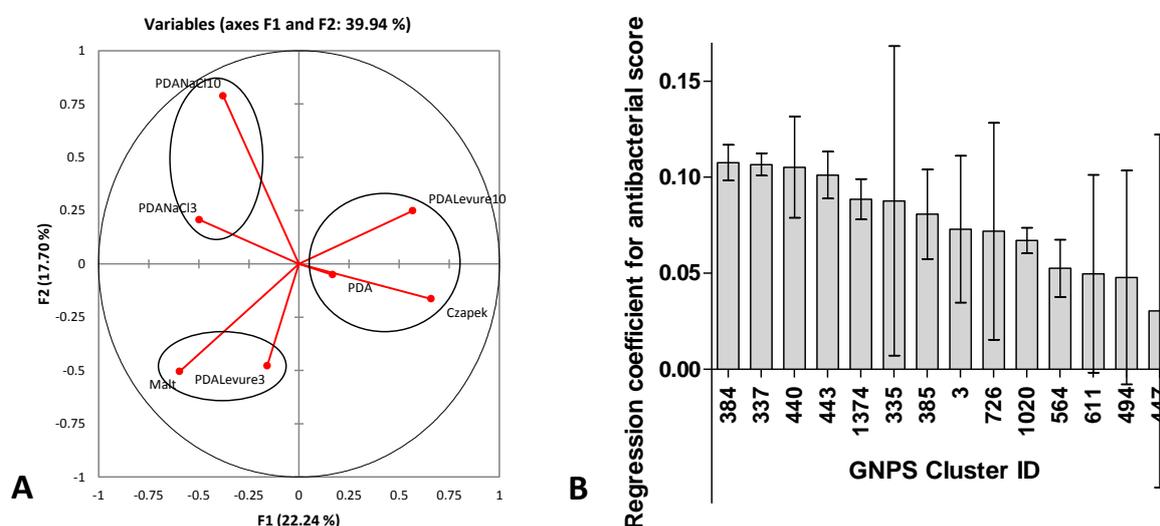


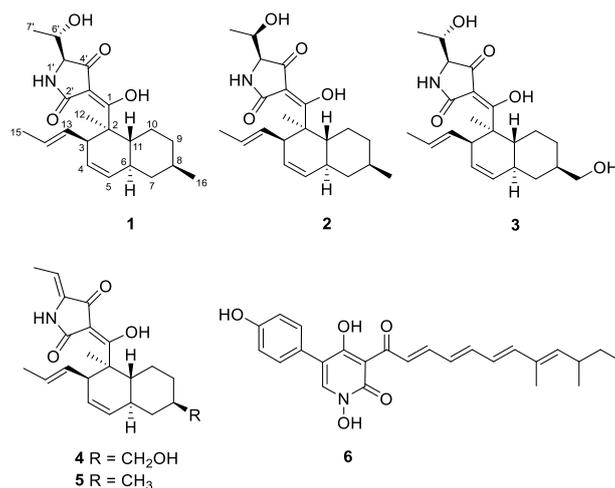
Figure 1. (A): OSMAC extracts in PCA analysis (B): Regression coefficients as calculated by OPLS analysis. Only clusters with mean regression coefficient > 0.03 are represented.

Table 1. Identification of bioactivity marker ions in *I. farinosa* metabolomic profiles

GNPS Cluster ID	m/z	Retention time (t _R , min)	Molecular formula ^a	Compound ^a
384	356.222	9.89 and 10.06	C ₂₂ H ₂₉ NO ₃ , (M+H) ⁺	5 and n.i.
337	338.211	9.89 and 10.06	C ₂₂ H ₂₇ NO ₂ , (M+H-H ₂ O) ⁺	5 and n.i.
440	374.232	8.10 and 8.38	C ₂₂ H ₃₂ NO ₄ , (M+H) ⁺	1 and 2
443	374.257	9.00	n.d. (doubly charged ion)	n.i.

^a n.d.: not determined. n.i.: not isolated.

Based on these results we undertook to isolate the putative bioactive compounds from the *I. farinosa* large scale culture. Paecilosetin (**1**) along with four new paecilosetin analogues (**2–5**) and farinosone B (**6**) were eventually isolated in the process.



Compound **1** was isolated as a pale yellow solid. A molecular formula of C₂₂H₃₁NO₄ was determined based on HRESIMS analysis, which showed a pseudomolecular ion at m/z 374.2318 [M+H]⁺ (calcd for C₂₂H₃₂NO₄, 374.2326). MS analysis and evaluation of NMR data suggested that compound **1** was the paecilosetin (Figure 5), previously isolated from *Paecilomyces farinosus* (syn. *Isaria farinosa*)¹³ in New Zealand.¹⁵ ¹H-¹H nOe correlations confirmed that the relative configuration of the decaline subunit was identical to paecilosetin and other compounds with the same decaline moiety: equisetin and trichosetin (Figure 3).^{19,20} The specific optical rotation data was also similar to the one given in the literature.¹⁵ As described in the literature for this class of compounds, a negative circular dichroism at 233 and 270 nm suggests a *S*-configuration at C-2 and C-5' (Figure S9).^{19,20} The configuration in C-6' has never been described in the literature. (*S*)- and (*R*)-MTPA esters of compound **1** were synthesized (respectively **1a** and **1b**, Figure 2). The chemical shift differences between protons H-5' (+0.49) and H-7' (-0.04) in **1a** and **1b** allowed us to assign the relative configuration in C-6' as *S* for paecilosetin (**1**).

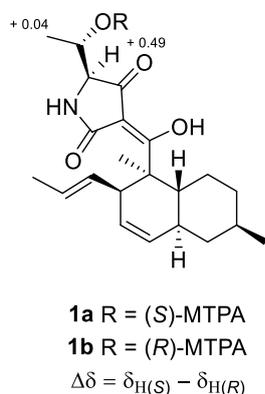


Figure 2. Chemical shifts differences between the (*S*)-MTPA and (*R*)-MTPA esters of **1**.

Compound **2** was isolated as a pale yellow solid and showed the same molecular formula as **1** (m/z 374.2317 $[M+H]^+$, calcd. for $C_{22}H_{32}NO_4$, 374.2326). In comparison with **1**, 1H NMR data of compound **2** showed differences at H-5' (at 3.77 ppm instead of 3.69 for **1**) and H-7' (1.03 ppm instead of 1.29 for **1**). ^{13}C NMR data showed highest chemical shift differences for C-6' and C-7' (Table 2, Figure 4). 2D NMR spectra (COSY, HMBC, NOESY) were also very similar. 1H - 1H nOe correlations confirmed that the relative configuration were identical in the decaline moiety. For example, correlations H-6/H-8 and H-6/H-12 indicated that these protons are on the same face of the decaline (Figure 3). Altogether, these data suggested that **1** and **2** are diastereoisomers in C-5' and/or C-6'. The absolute configuration of **2** was determined by the comparison of CD spectrum with the one of **1**, suggesting an *S*-configuration at C-2 and C-5' like in **1** (Figure S17). As the strongest ^{13}C chemical shift differences with **1** are for C-6' and C-7', it has been tentatively assumed that the absolute configuration should be *R* in C-6'. Hence, compound **2** is 2*S*, 3*R*, 6*S*, 8*R*, 11*R*, 5'*S* and 6'*R*. This compound was named paecilosetin B.

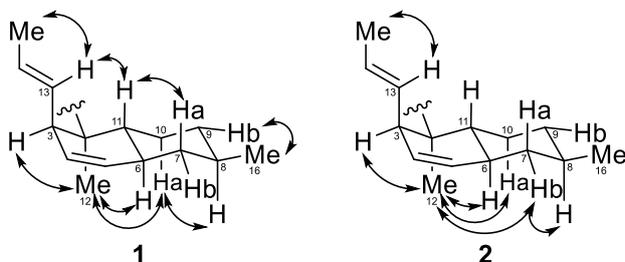


Figure 3. Key NOESY correlations of paecilosetin (**1**) and paecilosetin B (**2**).

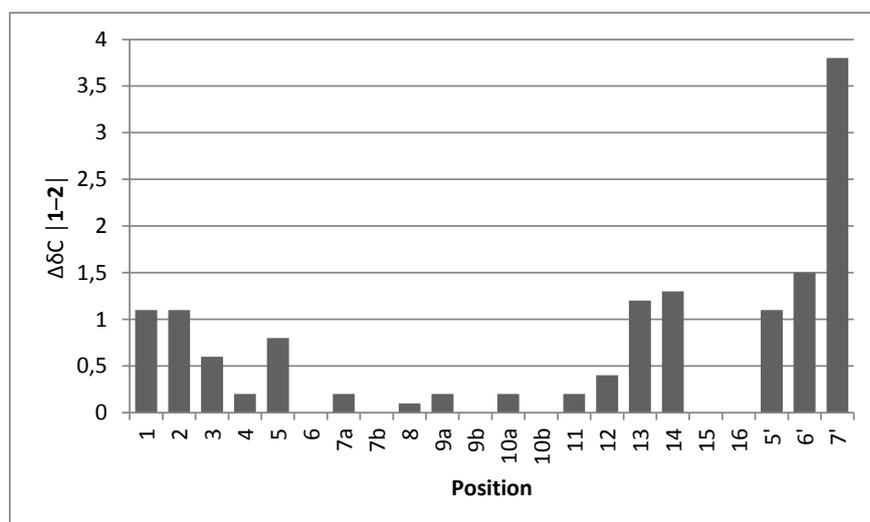


Figure 4. Absolute values of ^{13}C chemical shift between paecilosetin (**1**) and paecilosetin B (**2**).

Compound **3** exhibited a protonated molecular ion peak at m/z 390.2266 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{22}H_{32}NO_5$, 390.2275) corresponding to 8 degrees of unsaturation. The 1H and ^{13}C NMR data (Table 2) of **3** were similar to those of **1** excepted for the methyl in C-16. Instead, H-16 protons and C-16 were seen at δ_H 3.37/3.42 and δ_C 69.1. 1H - 1H COSY correlations between H-8 and H-16a/b, and 1H - ^{13}C HMBC correlation of H-16 with C-7 demonstrated that C-16 was hydroxylated. Eventually, **3** relative and absolute configurations were found identical to those of **1** by comparison of 1D and 2D NMRs, and CD data (Figure S25). Compound **3** is therefore 2*S*, 3*R*, 6*S*, 8*R*, 11*R*, 5'*S*, 6'*S* and was named paecilosetin C.

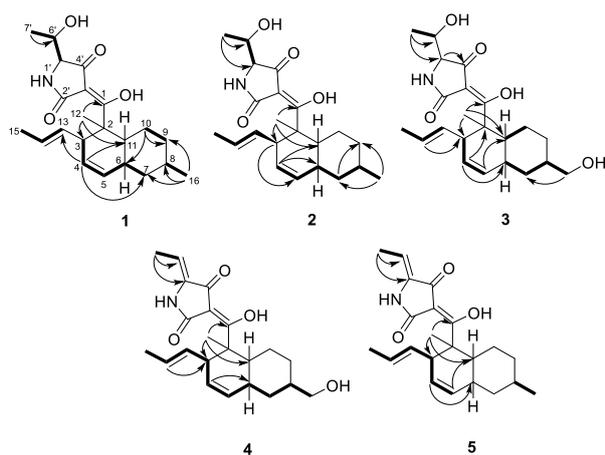


Figure 5. Key 1H - 1H COSY (bold bonds) and 1H - ^{13}C HMBC (plain arrow) correlations of **1**-**5**.

Compound **4** was given the molecular formula $C_{22}H_{29}NO_4$ based on HRESIMS analysis (m/z 372.2158 $[M+H]^+$, calcd. for $C_{22}H_{30}NO_4$, 372.2169). This formula indicates 9 degrees of unsaturation. The 1H and ^{13}C NMR data of compound **4** were closed to those of **3** (Table 2). Contrary to **3**, H-5' was absent and H-6' shifted to δ 5.51. Based on chemical shift, it was presupposed that H-6' was an olefinic protons. This was confirmed by the chemical shift in H-7' (δ 1.77) and the HMBC couplings H-7'/C-6' and H-7'/C-5' (Figure 5), with C-5' and C-6' at δ 138.1 and 103.7, respectively. The similar NMR data and the obvious biosynthetic link between compounds **1**-**5** allows us to propose the preservation of the absolute configuration of the asymmetric centres (i.e., 2*S*, 3*R*, 6*S*, 8*R*, 11*R*). This was further confirmed as for **1** based on CD spectrum (Figure S32). Compound **4** was named paecilosetin D.

Compound **5** isolated as a white solid had the molecular formula $C_{22}H_{29}NO_3$ as determined by HRESIMS analysis, which showed a protonated molecular ion at m/z 356.2213 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{22}H_{30}NO_3$, 356.2220). NMR data of **5** revealed to be similar to those of **4** (Table 2), with the hydroxymethyl substituent in C-8 in **4** being replaced by methyl substituent (observed at δ_H 0.84 ppm), as for compounds **1** and **2** (Table 2).

Table 2. ¹H and ¹³C NMR data of **1–5**.

position	1		2		3		4		5	
	δ_C^a , type	δ_H^b m, (J in Hz)	δ_C^a , type	δ_H^b m, (J in Hz)	δ_C^c , type	δ_H^d m, (J in Hz)	δ_C^c , type	δ_H^d m, (J in Hz)	δ_C^c , type	δ_H^d m, (J in Hz)
1	202.3, C ^e		203.4, C ^e		204.1, C ^e		204.2, C ^e		203.7, C ^e	
2	50.8, C ^e		51.9, C ^e		52.5, C ^e		52.5, C ^e		52.1, C ^e	
3	46.3, CH	3.49, m	45.7, CH	3.72, m	45.4, CH	4.01, m	45.5, CH ^e	3.95, m	44.7, CH ^e	4.08, m
4	131.3, CH	5.41, m	131.1, CH	5.38, m	130.9, CH	5.39, m	131.0, CH	5.41, m	129.2, CH	5.35, m
5	128.1, CH	5.37, ddd (9.9 ; 4.7 ; 2.0)	128.9, CH	5.36, m	129.4, CH	5.38, m	129.3, CH	5.39, m	131.0, CH	5.34, m
6	40.1, CH	1.86, m	40.1, CH	1.81, m	39.7, CH	1.80, m	39.8, CH	1.81, m	40.4, CH	1.74
7	43.8, CH ₂	a: 0.87, m b: 1.83, m	44.0, CH ₂	a: 0.84, m b: 1.80, m	38.4, CH ₂	a: 0.90, m b: 1.95, m	38.4, CH ₂	a: 0.85, m b: 1.92, m	44.2, CH ₂	a: 0.78 b: 1.75
8	34.9, CH	1.53, m	35.0, CH	1.50, m	42.8, CH	1.58, m	42.7, CH	1.59, m	35.0, CH	1.41
9	37.1, CH ₂	a: 1.09, m b: 1.77, m	37.3, CH ₂	a: 1.09, m b: 1.72, m	30.9, CH ₂	1.29, m	29.3, CH ₂ ^e	1.33, m	30.9, CH ₂	1.29
10	29.5, CH ₂	a: 1.06, m b: 2.00, m	29.3, CH ₂	a: 0.96, m b: 1.92, m	29.3, CH ₂	a: 0.91, m b: 2.03, m	27.1, CH ₂ ^e	a: 0.97, m b: 2.03, m	29.8, CH ₂	a: 0.80 b: 1.80
11	41.6, CH	1.69, m	41.8, CH	1.68, m	42.3, CH	1.76, m	42.4, CH ^e	1.72, m	42.2, CH	1.62
12	14.6, CH ₃	1.45, s	15.0, CH ₃	1.40, s	15.3, CH ₃	1.38, s	15.3, CH ₃ ^e	1.40, s	14.9, CH ₃ ^e	1.36, s
13	132.7, CH	5.17, m	133.9, CH	5.16, m	134.3, CH	5.16, dd (14.5, 9.2)	134.2, CH ^e	5.19, m	134.5, CH ^e	5.21, dd (15.1 ; 8.6)
14	127.9, CH	5.28, dq (14.7 ; 6.4)	126.6, CH	5.26, dq (14.9 ; 6.3)	126.6, CH	5.28, dq (14.6, 6.5)	126.5, CH ^e	5.28, dq (21.0 ; 6.1)	126.0, CH ^e	5.26, dq (8.8 ; 6.1)
15	18.2, CH ₃	1.52, m	18.2, CH ₃	1.49, m	18.3, CH ₃	1.41, m	18.4, CH ₃	1.51, d (5.6)	18.5, CH ₃	1.50, d (6.0)
16	23.1, CH ₃	0.94, d (6.4)	23.1, CH ₃	0.92, d (6.4)	69.1, CH ₂	a: 3.37, m b: 3.43, dd (10.5, 5.8)	69.0, CH ₂	3.38, m	23.2, CH ₃	0.84, m
1'	NH		NH		NH		NH		NH	
2'	C, nd		C, nd		134.1, C ^e		C, nd		C, nd	
3'	C, nd		C, nd		127.0, C ^e		C, nd		C, nd	
4'	C, nd		192.6, C ^e		198.6, C ^e		C, nd		C, nd	
5'	67.3, CH ^e	3.69, m	66.2, CH	3.77, m	65.6, CH	3.52, m	138.1, C ^e		132.8, C ^e	
6'	68.1, CH	4.06, qd (6.5 ; 3.1)	69.6, CH	4.06, m	68.7, CH	4.08, m	103.7, CH ^e	5.51, q (7.5)	102.3, CH ^e	5.48, q (7.5)
7'	20.6, CH ₃	1.29, d (6.6)	16.8, CH ₃	1.03, d (6.3)	19.8, CH ₃	1.25, d (6.1)	12.1, CH ₃ ^e	1.77, d (7.5)	11.9, CH ₃	1.76, d (7.5)

^a recorded at 125 MHz, ^b recorded at 500 MHz, ^c recorded at 200 MHz, ^d recorded at 600 MHz, ^e δ_C determined by 2D experiments, nd: not determined

The relative and absolute configurations of **5** were proposed to be identical to those of other paecilosetins isolated. Consequently, the 2*S*, 3*R*, 6*S*, 8*R*, 11*R* absolute configuration is proposed for compound **5** which was named paecilosetin E.

Finally, comparison of NMR and MS data of compound **6** with literature values allowed identification of **6** as farinosone B, a metabolite isolated previously from *Paecilomyces farinosus* (syn. *Isaria farinosa*).¹⁴

The antimicrobial activities of isolated compounds were assayed to confirm metabolomic information. Paecilosetin (**1**) and farinosone B (**6**) exhibited interesting antibacterial activity with MIC 2–4 µg /mL on *S. aureus* and SARM. Both compounds were mentioned in OPLS antibacterial table under cluster ID 440 and 611, respectively (Table 1 and Table S1).

Compound **1** was also antifungal. In contrast compounds **3–5** were not active and paecilosetin B (**2**) appeared to be less active.

The activity observed in OSMAC extracts seemed to be principally attributed to **1**. However some compounds identified by OPLS analysis were not isolated and may be involved in activity.

Table 3. Antimicrobial activity of compounds **1–6** and OSMAC extracts.

bioassay	1	2	3	4	5	6	A	B	C	D	E	F	Pos. Ctrl. ^a
MIC on <i>S. aureus</i>	2	32	>128	>128	>128	2	>256	>256	>256	>256	256	>256	0.2
MIC on MRSA	2	16	>128	>128	128	4	256	64	>256	16	64	8	0.2
MIC on <i>C. albicans</i>	16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	64	64	128	32	64	32	4
MIC on <i>T. rubrum</i>	16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	128	16	>256	64	64	16	4

^a Positive control: oxacillin for *S. aureus*, vancomycine for MRSA, fluconazole for *C. albicans* and *T. rubrum*.

A: PDA medium, B: Yeast extract 3g/L, C: Yeast extract 10g/L, D: NaCl 3g/L, E: NaCl 10g/L, F: Malt extract

n.d. : not determined

CONCLUSION

In this paper we reported successful method using multivariate analysis applied to UHPLC-MSMS data in combination with biological activity to identify putative compounds contributing to antimicrobial activity observed in OSMAC extracts of *I. farinosa* fungus. Paecilosetin (**1**), along with four new analogues (**2–5**) and farinosone B (**6**) were isolated. Compounds **1**, **2** and **6** exhibited interesting antibacterial activities.

Furthermore, from an ecological point of view, production of bioactive metabolites by the entomopathogenic fungus *Isaria farinosa* suggests that they constitute an important factor of defence against other competing microorganisms of environment.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Optical rotations were measured on an Anton Paar MCP 300 polarimeter in a 100 mm long, 350 μ L cell. UV spectra were recorded using a Perkin-Elmer Lambda 5 spectrophotometer. CD spectra were acquired at 20°C on a JASCO J-810 spectropolarimeter. NMR spectra were recorded on a Bruker 500 MHz spectrometer, or a Bruker 600 MHz spectrometer equipped with a 1 mm inverse detection probe. The chemical shifts (δ) are reported as ppm based on the TMS signal, and coupling constants (J) are in hertz. High Resolution ESITOFMS measurements were performed using a Waters Acquity UHPLC system with a column bypass coupled to a Waters Micromass LCT Premier time-of-flight mass spectrometer equipped with an electrospray interface (ESI). Flash chromatography was performed on a Grace Reveleris system with dual UV and ELSD detection and equipped with a 120 g C₁₈ column. The flow rate was 80 mL/min, and the effluents were monitored at 210 and 270 nm. TLC analysis was conducted on 60 A F254 Merck plates and visualized using UV and phosphomolybdic acid. Analytical and preparative HPLC work was conducted using a Gilson system equipped with a 322 pumping device, a GX-271 fraction collector, a 171 diode array detector, and a prepELSIII electrospray nebulizer detector. The columns used for these experiments included: Phenomenex Luna C₁₈ 5 μ m 4.6 \times 250 mm, Phenomenex Luna C₈ 5 μ m 4.6 \times 250 mm, Phenomenex PFP 5 μ m 4.6 \times 250 mm analytical columns and Phenomenex Luna C₁₈ 5 μ m 21.2 \times 250 mm, Phenomenex Luna C₈ 5 μ m 21.2 \times 250 mm, Phenomenex PFP 5 μ m 21.2 \times 250 mm preparative one. The flow rate was set to 1 or 21 mL/min, respectively, using a linear gradient of H₂O mixed with an increasing proportion of acetonitrile. Both solvents were modified with 0.1% formic acid. All solvents were HPLC grade.

Collection and Identification of *Isaria farinosa* SNB-CLL10038. The fungal strain was isolated from an unidentified insect larva and identified as *Isaria farinosa* by Christian Lechat (ASCOFRANCE). The strain SNB-CLL10038 was saved in triplicate at -80 °C in H₂O – Glycerol (50/50). A sample was submitted for amplification of nuclear ribosomal internal transcribed spacer region ITS1 which allowed identification by comparison with NCBI sequence. The sequence was registered in the NCBI Genbank database with the accession number MF950892.

OSMAC cultures and extraction. *I. farinosa* was cultivated under several culture conditions: potato dextrose agar (PDA), Czapek, malt extract, PDA added with yeast extract (3 and 10 g/L), PDA added with NaCl (3 and 10 g/L) on 10 Petri dishes (diameter 10 cm) for 15 days. The fungus on culture media was macerated with 250 mL EtOAc for

24 h on a shaking platform, then filtered and washed twice with H₂O. Solvent evaporation yielded: 18.4 mg extract on PDA medium, 5.3 mg on Czapek medium, 32.3 mg on malt extract, 34.2 mg on PDA added with 3g/L yeast, 28.4 mg on PDA medium added with 10g/L yeast, 28.2 mg on PDA medium added with 3g/L NaCl, 36.1 mg on PDA medium added with 10g/L NaCl. Sterile culture media were also extracted in the same conditions for subtraction of culture media peaks in metabolomic analysis.

Large scale cultivation on PDA and fractionation. The fungal strain was also cultivated on PDA in 248 14-cm Petri Dishes at 28 °C during 15 days. The culture medium containing the mycelium was cut into small pieces and macerated with ethyl acetate (EtOAc) as previously. The organic solvent was evaporated to dryness under reduced pressure to yield 3.34 g of an oily brown-red crude extract. A part of the crude extract (3 g) was fractionated by reverse flash chromatography on C₁₈ column with linear gradient water – acetonitrile (v/v, 1:0 to 0:1 in 35 min, flow rate 80 mL/min) to generate 5 fractions: Fr1 (20.2 mg, 0.66 %), Fr2 (76.6 mg, 2.52 %), Fr3 (256.4 mg, 8.43 %), Fr4 (54.1 mg, 1.78 %) and Fr5 (449.9 mg, 14.8 %). Another gradient of acetonitrile - methylene chloride (v/v, 1:1 to 0:1 in 15 min, flow rate 80 mL/min) was conducted to generate 3 additional fractions: Fr6 (831.1 mg, 27.3 %), Fr7 (947.1 mg, 31.15 %) and Fr8 (177.9 mg, 5.85 %).

UHPLC-MS. Metabolome profiling was conducted with a Thermo UHPLC-HRMS system. Analyses of each extract (1.0 µL injected, 2 µg on column) were performed in electrospray positive ionization mode in the 133.4-2000 Da range in centroid mode. The mass detector was an Orbitrap MS/MS FT Q-Exactive focus mass spectrometer. The analysis was conducted in FullMS data dependent MS² mode. In FullMS, resolution was set to 70,000 and AGC target was 3.10⁶. In MS², resolution was 17,500, AGC target 10⁵, isolation window 0.4 Da, normalized collision energy 30, with 20 s dynamic exclusion. UHPLC column was a Phenomenex Luna Omega polar C₁₈ 150 x 2.1 nm, 1.6 µm. The column temperature was set to 42°C, and the flow rate was 0.5 mL/min. The solvent system was a mixture of water with increasing proportions of acetonitrile, both solvents modified with 0.1% formic acid.

Data pre-treatment and statistical analysis.

Extracts/fractions (Group 1) and culture media (Group 2) profiles were compared with the GNPS data analysis workflow (gnps.ucds.edu) with Precursor and Fragment Ion Mass Tolerance 0.01, Cosine 0.65, and Minimum Peak intensity 100,000.²¹ The spectra clustering results (.clusterinfo file) were exported to Excel. A pivot table was generated with #ClusterIdx in columns, #Filename in lines, and maximum of #PreIntensity in boxes. The peaks from culture media were removed as follows: For each cluster, the ratio between average maximum of #PreIntensity for culture media profiles and average maximum of #PreIntensity for strain and fraction profiles was calculated. All clusters of spectra for which this ratio was larger than 10% were removed. 653 clusters remained.

Pearson (n) PCA analysis was conducted with XLSTAT 2014. Since profiles of fractions F1-F5 were not included in the PCA, 351 clusters remained. #PreIntensity values were scaled and centred. The principal components 1 and 2 describe 40 % of the variability.

Since some of the main components of these extracts/fractions may explain the antibacterial and antifungal activities, an Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis was conducted on Umetrics SIMCA 14. Bioassays could not be conducted on the Czapek fungal extract, the profile of which was therefore not considered, leaving 612 clusters out of 653. A biological activity score was included as y-variable. The score was calculated separately for antifungal and antibacterial activity, as follows: a score 0 was given if MIC > 256 µg/mL, 1 for 256, 2 for 128, 3 for 64, 4 for 32, 5 for 16, 6 for 8, and 7 for MIC < 8. Since activities were measured on two bacteria and two fungi, both scores obtained were added to give the antibacterial and antifungal score, respectively. The GNPS clusters were sorted out by maximum #PreIntensity value, and the only clusters kept were those accounting for more than 5.10^7 in at least one analysis (159 clusters of spectra left).

The OPLS analysis for antibacterial score converged to $R^2 = 0.999999$ and $Q^2 = 0.789432$ using the autofit tool, indicating good predictivity of the model. The regression coefficients related to scaled and centred x-variables are given in Figure 1 (coefficients with mean > 0.03) and Table S1 (full dataset). On the other hand, The OPLS analysis for antifungal score did not converge using the autofit tool ($R^2 = 0.774827$ and $Q^2 = 0.27753$), indicating poor predictivity of the model. The regression coefficients related to scaled and centred x-variables are given in Table S2.

Isolation of target compounds. The metabolites sorted out by the OPLS analysis were in fractions 4–6. Compounds **3** (1.2 mg, t_R 5.0 min) and **4** (1.0 mg, t_R 12.0 min) were isolated in Fr4 using preparative HPLC with H₂O–CH₃CN (45:55 to 0:100 in 25 min, flow rate 21mL/min). Compound **1** (31.8 mg, t_R 13.0 min), **2** (10.7 mg, t_R 15.2 min) and **6** (0.5 mg, t_R 13.9 min) were obtained from Fr5 after preparative HPLC (H₂O–CH₃CN, 26:74 to 0:100 in 20 min, flow rate 21mL/min). Compound **5** (0.4 mg, t_R 12.1 min) was isolated from Fr6 in preparative HPLC (H₂O–CH₃CN, 25:75 to 7:93 in 20 min, flow rate 21mL/min).

Paecilosetin (**1**): pale yellow oil; $[\alpha]^{20}_D - 490^\circ$ (c 0.1, MeOH); ¹H and ¹³C NMR data, see Table S3; HRESITOFMS m/z 374.2297 [M+H]⁺ (calcd for C₂₂H₃₂NO₄, 374.2331).

Paecilosetin B (**2**): pale yellow oil; $[\alpha]^{20}_D - 429^\circ$ (c 0.1, MeOH); ¹H and ¹³C NMR data, see Table S4; HRESITOFMS m/z 374.2334 [M+H]⁺ (calcd for C₂₂H₃₂NO₄, 374.2331).

Paecilosetin C (**3**): white powder; $[\alpha]^{20}_D - 164^\circ$ (c 0.1, MeOH); ¹H and ¹³C NMR data, see Table S5; HRESITOFMS m/z 390.2298 [M+H]⁺ (calcd for C₂₂H₃₂NO₅, 390.2281).

Paecilosetin D (**4**): white powder; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} - 91^{\circ}$ (c 0.1, MeOH); ^1H and ^{13}C NMR data, see Table S6; HRESITOFMS m/z 372.2202 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NO}_4$, 372.2175).

Paecilosetin E (**5**): white powder; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} - 50^{\circ}$ (c 0.1, MeOH); ^1H and ^{13}C NMR data, see Table S7; HRESITOFMS m/z 356.2239 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NO}_3$, 356.2226).

Farinosone B (**6**): white powder; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} -44^{\circ}$ (c 0.07, MeOH); ^1H and ^{13}C NMR data, see SI; HRESITOFMS m/z 422.1969 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{NO}_5$, 422.1967).

MTPA derivatives of 1. In an NMR sample tube (3 mm diameter) 1 mg of dimethylaminopyridine (DMAP) was added to 1.0 mg (8.2 μmol) of compound **1**. Nine microliter of pyridine- d_5 and 600 μL of CDCl_3 were added to this mixture. Then, 1.35 μL of (*R*)-MTPA chloride (72 μmol) was added. The resultant reaction mixture was stirred at RT for 120 min, to afford (*S*)-MTPA ester **1a**. The identical procedure was carried out to obtain the (*R*)-MTPA ester **1b** from (*S*)-MTPA chloride.

Antimicrobial Assays. The ATCC strains were purchased at Institut Pasteur and clinical isolate was provided by Phillipe Loiseau (Univ. Paris Sud). The strains used in this study were: *Candida albicans* ATCC10231, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC33591 and *Trichophyton rubrum* SNB-TR1. Extracts, fractions and pure compounds were tested according to the reference protocol of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.²² The MIC value was obtained after 24 h for bacteria, 48 h for yeast and 5 days for *T. rubrum*.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Full spectroscopic data for compound **1-5** are available free of charge via the internet at <http://pubs.acs.org>

AUTHOR INFORMATION

Corresponding author

*(V. Eparvier) Tel: +33 169 82 36 79. E-mail: veronique.eparvier@cnrs.fr

*(S. Touré) Tel : +33 169 82 36 65. E-mail: seinde.toure@cnrs.fr

Authors contributions

[†]S. Touré and O. Brel contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was part of the Laboratory of Excellence « Centre d'étude de la Biodiversité Amazonienne » [Labex CEBA, (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01)]. The authors are very grateful to Christian Lechat for the transfer of the biological material.

REFERENCES

1. Offret, C.; Desriac, F.; Le Chevalier, P.; Mounier, J.; Jégou, C.; Fleury, Y.; Laurienzo, P. *Mar. Drugs*. 2016, 14, 129.
2. Gunatilaka, A. A. L. *J. Nat. Prod.* 2006, 69, 509–526.
3. Wilson, Z. E.; Brimble, M. A. *Nat. Prod. Rep.* 2009, 26, 44–71.
4. M. Nett, H. Ikeda, B.S. Moore. *Nat. Prod. Rep.* 2009, 26, 1362–1384.
5. Bertrand, S.; Schumpp, O.; Bohni, N.; Monod, M.; Gindro, K.; Wolfender, J. L. *J. Nat. Prod.* 2013, 76, 1157–1165.
6. Hewage, A. R.; Aree, T.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P. *Phytochem.* 2014, 108, 87–94.
7. VanderMolen, K. M.; Raja, H.; El-Elimat, T.; Oberlies, N. H. *AMB Express*. 2013, 3, 71.
8. Marmann, A.; Aly, A. H.; Lin, W.; Wang, B.; Proksch, P. *Mar. Drugs*. 2014, 12, 1043–1065.
9. Petit, R. K. *Microb. Biotechnol.* 2011, 4, 471–478.
10. Rutledge, P. J.; Challis, G. L. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015, 13, 509–523.
11. Bode, H. B.; Bethe, B.; Hof, R.; Zeeck, A. *Chembiochem.* 2002, 3, 619–627.
12. Nirma, C.; Eparvier, V.; Stien, D. *J. Antibiot.* 2015, 1–5.
13. Zimmermann, G. *Biocont. Sci. Tech.* 2008, 18, 865–901.
14. Cheng, Y., Schneider, B., Riese, U.; Schubert, B.; Li, Z.; Hamburger, M. *J. Nat. Prod.* 2004, 67, 1854–1858.
15. Lang, G., Blunt, J. W., Cummings, N. J.; Cole, A. L. J.; Munro, M. H. G. *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 810–811.
16. Zhang, Y.; Liu, S.; Liu, H.; Liu, X.; Che, Y. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1364–1367.
17. Sakakura, A.; Kouichi, S.; Katsuzaki, H.; Komiya, T.; Imamura, T.; Aizono, Y.; Imai, K. *Tetrahedron Lett.* 2005, 46, 9057–9059.
18. Touré, S.; Dusfour, I.; Stien, D.; Eparvier, V. *Tetrahedron Lett.* 2017, 58, 3727–3729.
19. Phillips, N. J.; Goodwin, J. T.; Fraiman, A.; Cole, R. J.; Lynn, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 8223–8231.
20. Marfori, E. C.; Kajiyama, S.; Fukusaki, E.; Kobayashi, A. *Z. Naturforsch. C: J. Biosci.* 2002, 57, 465–470.
21. Wang, M.; Carver, J. J.; et al. *Nat. Biotech.* 2016, 34, 828–837.
22. Rodrigues, A. M. S.; Theodoro, P. N. E. T.; et al. *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 1706–1707.

SUPPORTING INFORMATION FOR:

OSMAC and metabolomics-based approaches for the targeted isolation of antimicrobial tetramic acids derivatives from *Isaria farinosa* SNB-CLL10038

Seindé Touré,^{*,†,‡} Orianne Brel,^{†,‡} Christian Lechat,[‡] Isabelle Dusfour,[§] Didier Stien,[⊥]
Véronique Eparvier^{*,†}

[†] CNRS – Institut de Chimie des Substances Naturelles, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

[‡] ASCOFrance, Villiers-en-bois, France

[§] Institut Pasteur de la Guyane, Unité de Contrôle et Adaptation des Vecteurs, BP6010, 97306 Cayenne, France

[⊥] Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

- *Corresponding author.*

(V. Eparvier) Tel: +33 1 69 82 36 79. E-mail: veronique.eparvier@cnrs.fr

(S. Touré) Tel: +33 1 69 82 36 65. E-mail: seinde.toure@cnrs.fr

Table of contents:

LC-MS profiles of the metabolites of *Isaria farinosa* strain on different media

OPLS regression coefficients for antibacterial activity

OPLS regression coefficients for antifungal activity

Full spectroscopic data of **1**

Full spectroscopic data of **2**

Full spectroscopic data of **3**

Full spectroscopic data of **4**

Full spectroscopic data of **5**

¹H NMR and MS data of **6**

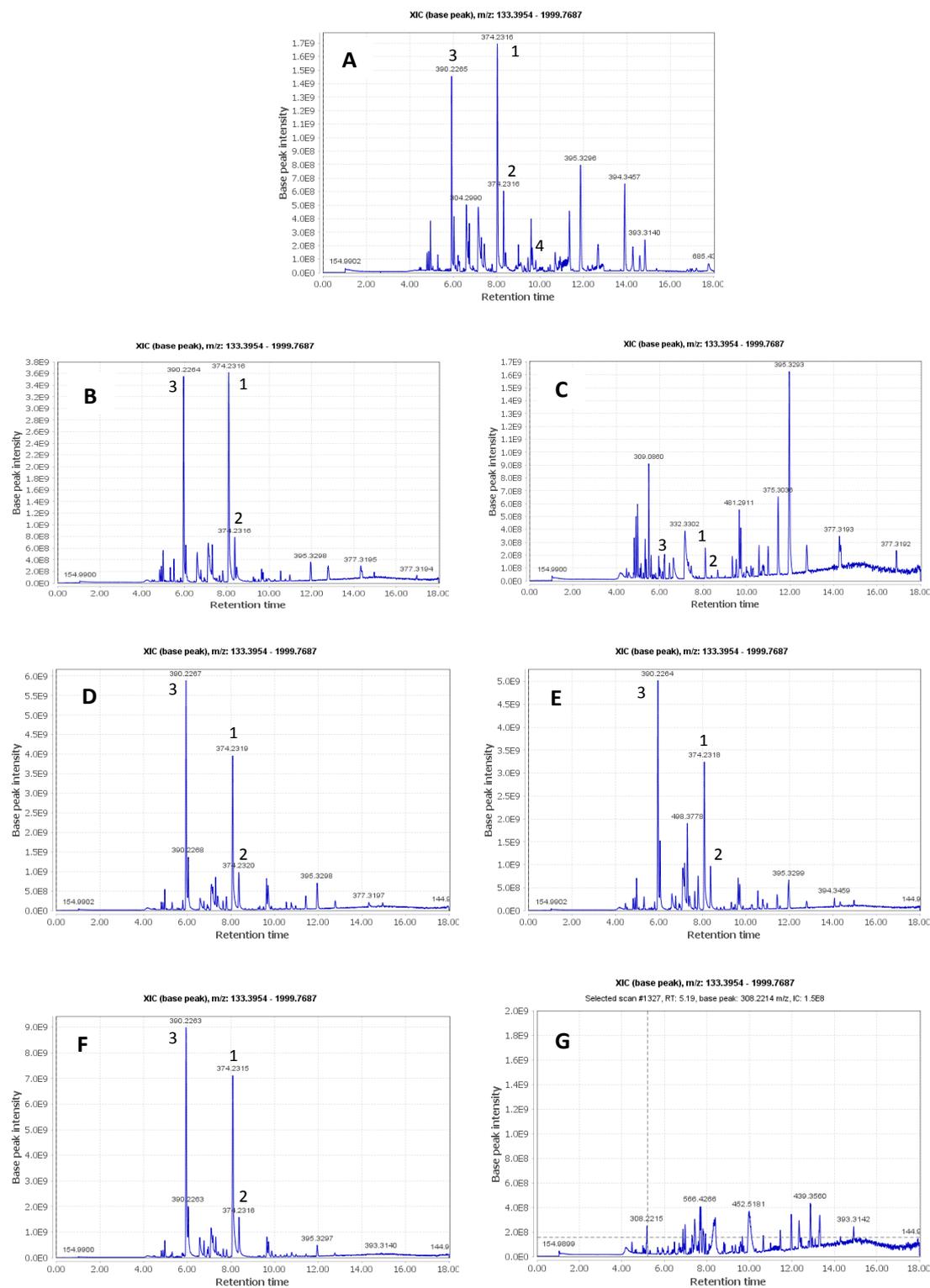


Figure S1. LC-MS profiles of *Isaria farinosa* extracts on different media: (A) Potato Dextrose agar PDA; (B) Yeast 3g/L; (C) Yeast 10g/L, (D) PDA with NaCl 3g/L; (E) PDA with NaCl 10g/L; (F) Malt extract; (G) Czapek Dox. Major compounds Paecilosetin A-C (1–3) were indicated on profiles.

Table S1. Regression coefficients calculated by OPLS analysis for antibacterial activity (full data).

Cluster ID	M1.CoeffCS[1](Grade (antibacterial))	2.44693* M1.CoeffCS[1](Grade (antibacterial))cvSE
384	0.1076	0.00928676
337	0.106596	0.00581134
440	0.105195	0.026381
443	0.101084	0.0121687
1374	0.0884735	0.010551
335	0.0876429	0.0806405
385	0.0806903	0.023301
3	0.072863	0.0382459
726	0.0718286	0.0564538
1020	0.0669663	0.00662732
564	0.0524824	0.014901
611	0.0496293	0.0515228
494	0.0477637	0.0557121
447	0.0302816	0.0919257
1353	0.0275859	0.0980158
1381	0.0196615	0.0357315
429	0.0181802	0.0355963
275	0.0176881	0.0512618
376	0.0166336	0.00647245
381	0.0146076	0.0495473
565	0.0125603	0.0180681
427	0.0122207	0.0261441
456	0.0111159	0.0449542
149	0.010705	0.0349818
588	0.0102578	0.0655852
15	0.00856661	0.0789717
967	0.00494164	0.00451088
448	0.00449265	0.0322043
645	0.00373306	0.00673722
575	0.00349447	0.0307804
692	0.00304275	0.0226653
556	0.00287781	0.0243616
486	0.00194767	0.0181685
460	0.00145906	0.0472365
509	0.00126163	0.00560596
1036	0.00084289	0.00541645
495	0.00041208	0.00433184
276	0.00041208	0.00433184
695	0.00041208	0.00433184
969	0.00041207	0.00433185

1032	0.00041207	0.00433185
892	0.00041207	0.00433185
1109	0.00041207	0.00433185
1040	0.00041207	0.00433185
548	0.00041207	0.00433185
1163	0.00041207	0.00433185
1220	0.00041207	0.00433185
1080	0.00041207	0.00433185
709	0.00041207	0.00433185
1224	0.00041207	0.00433185
1229	0.00041207	0.00433185
1320	0.00041207	0.00433185
55	0.00041207	0.00433185
1279	0.00041207	0.00433185
746	0.00041207	0.00433185
466	0.00041207	0.00433185
266	0.00041207	0.00433185
78	0.00041207	0.00433185
1054	0.00041207	0.00433185
93	0.00041207	0.00433185
1200	0.00041207	0.00433185
273	0.00041207	0.00433185
206	0.00041207	0.00433185
299	0.00041207	0.00433185
752	0.00041207	0.00433185
741	0.00041207	0.00433185
1167	0.00041207	0.00433185
665	0.00041207	0.00433185
371	0.00041207	0.00433185
348	0.00041207	0.00433185
1252	0.00041207	0.00433185
483	0.00041207	0.00433185
477	0.00041207	0.00433185
1259	0.00041207	0.00433185
367	0.00041207	0.00433185
1198	0.00041207	0.00433185
1274	0.00041207	0.00433185
485	0.00041207	0.00433185
932	0.00041207	0.00433184
1142	0.00041207	0.00433184
441	0.00041207	0.00433184
2	0.00041207	0.00433184
1307	0.00041207	0.00433184
1039	0.00041207	0.00433184
769	-0.00164146	0.00503823
377	-0.00166098	0.0170971

1238	-0.00197196	0.00555924
150	-0.00362281	0.0236038
151	-0.00421312	0.0207719
86	-0.004892	0.0160038
45	-0.0050969	0.0159432
103	-0.00513577	0.0155354
96	-0.00513577	0.0155354
16	-0.00513577	0.0155354
188	-0.00513577	0.0155354
24	-0.00513577	0.0155354
657	-0.00513577	0.0155354
198	-0.00513577	0.0155354
617	-0.00513577	0.0155354
79	-0.00513577	0.0155354
47	-0.00513577	0.0155354
193	-0.00513577	0.0155354
265	-0.00513577	0.0155354
61	-0.00513577	0.0155354
54	-0.00513577	0.0155354
238	-0.00513577	0.0155354
285	-0.00513577	0.0155354
365	-0.00513577	0.0155354
614	-0.00513577	0.0155354
189	-0.00513577	0.0155354
264	-0.00513577	0.0155354
694	-0.00513577	0.0155354
27	-0.00513577	0.0155354
80	-0.00513577	0.0155354
487	-0.00521439	0.0130299
986	-0.00582804	0.0106419
996	-0.00626573	0.0401871
50	-0.00724557	0.0174008
140	-0.00734876	0.0184316
293	-0.00734876	0.0184316
323	-0.00734876	0.0184316
66	-0.00734877	0.0184316
6	-0.00734877	0.0184316
25	-0.00734877	0.0184316
12	-0.00734877	0.0184316
65	-0.00734877	0.0184316
166	-0.00734877	0.0184316
305	-0.00734877	0.0184316
205	-0.00734877	0.0184316
602	-0.00765711	0.0228184
638	-0.00872279	0.0298694
77	-0.00982123	0.0236211

48	-0.00982123	0.0236212
545	-0.00982123	0.0236212
493	-0.00982123	0.0236212
1258	-0.00982123	0.0236212
507	-0.00982123	0.0236212
1044	-0.0111284	0.0196555
609	-0.0113974	0.0229952
618	-0.0157853	0.0156175
555	-0.0194369	0.0296076
1075	-0.0213729	0.0376378
610	-0.021733	0.0232802
58	-0.0225975	0.0109764
1014	-0.0228602	0.0300805
118	-0.0277351	0.0158881
496	-0.0278176	0.0608979
1068	-0.0287725	0.0178934
284	-0.0301085	0.0669013
705	-0.0335396	0.0364693
650	-0.0351097	0.0381808
663	-0.0369339	0.0338407
135	-0.0458705	0.0218535
123	-0.0608515	0.108731
467	-0.0675102	0.112837
465	-0.0703522	0.170651
820	-0.075314	0.0157168
815	-0.083257	0.0186887
1161	-0.0891753	0.0354575

Table S2. Regression coefficients calculated by OPLS analysis for antifungal activity (full data).

Cluster ID	M1.CoeffCS[1](Score (antifungal))	2.44693 * M1.CoeffCS[1](Score (antifungal))cvSE
726	0.0529336	0.0390652
1381	0.0496268	0.0543718
456	0.0485419	0.0744344
494	0.0465352	0.059466
448	0.0425848	0.0890857
149	0.0421294	0.0436333
460	0.0403269	0.0826096
335	0.0384315	0.0446254
1353	0.0365316	0.0487258
381	0.0350137	0.0403908
275	0.0348481	0.0864567
385	0.0319018	0.0461333
611	0.0260118	0.0546018
610	0.026002	0.0871143
284	0.0259054	0.0487542
663	0.0250802	0.0875995
996	0.0245158	0.0843933
1374	0.0223472	0.0418376
1161	0.0197974	0.0401452
440	0.0171076	0.0265693
443	0.0164934	0.0208159
820	0.0147953	0.0272266
565	0.0127995	0.0248444
645	0.0123206	0.0181705
815	0.0108195	0.0254882
447	0.00981556	0.0295105
509	0.00709549	0.0118863
377	0.00610687	0.0629484
1068	0.00601762	0.0221337
376	0.00578365	0.0112413
1036	0.00572327	0.0109881
588	0.00433027	0.0543111
427	0.00373771	0.0175764
564	0.00340143	0.0110448
3	0.00274997	0.0265609
486	0.00236055	0.0225515
969	0.00165097	0.00672395
1032	0.00165097	0.00672395
892	0.00165097	0.00672395

1109	0.00165097	0.00672395
1040	0.00165097	0.00672395
548	0.00165097	0.00672395
1163	0.00165097	0.00672395
1220	0.00165097	0.00672395
1080	0.00165097	0.00672395
709	0.00165097	0.00672395
1224	0.00165097	0.00672395
1229	0.00165097	0.00672395
1320	0.00165097	0.00672395
55	0.00165097	0.00672395
1279	0.00165097	0.00672395
746	0.00165097	0.00672395
466	0.00165097	0.00672395
266	0.00165097	0.00672395
78	0.00165097	0.00672395
1054	0.00165097	0.00672395
93	0.00165097	0.00672395
1200	0.00165097	0.00672395
273	0.00165097	0.00672395
206	0.00165097	0.00672395
299	0.00165097	0.00672395
752	0.00165097	0.00672395
741	0.00165097	0.00672395
1167	0.00165097	0.00672395
665	0.00165097	0.00672395
371	0.00165097	0.00672395
348	0.00165097	0.00672395
1252	0.00165097	0.00672395
483	0.00165097	0.00672395
477	0.00165097	0.00672395
1259	0.00165097	0.00672395
367	0.00165097	0.00672395
1198	0.00165097	0.00672395
1274	0.00165097	0.00672395
485	0.00165097	0.00672395
495	0.00165097	0.00672395
932	0.00165097	0.00672394
276	0.00165097	0.00672395
1142	0.00165097	0.00672394
441	0.00165097	0.00672394
2	0.00165097	0.00672394
1307	0.00165097	0.00672394
1039	0.00165097	0.00672394
695	0.00165097	0.00672395
967	0.00154776	0.00707362

618	0.00127361	0.0106018
384	0.00123992	0.0117742
429	0.0002432	0.0259139
150	2.19E-05	0.027458
1020	-0.00020371	0.012982
986	-0.0009719	0.00487837
496	-0.00142922	0.0273452
337	-0.00255994	0.0147535
1044	-0.00320531	0.00708456
769	-0.00387036	0.013944
705	-0.00414532	0.0738712
1238	-0.00476122	0.0156822
151	-0.0049286	0.0196971
1014	-0.00530491	0.0114408
575	-0.00628836	0.0157948
1075	-0.00753682	0.0147942
467	-0.00911031	0.067109
650	-0.0096643	0.0685601
58	-0.0105153	0.0187552
556	-0.0112742	0.0181824
118	-0.0112899	0.0173304
135	-0.0122129	0.0615631
692	-0.0122951	0.0576873
86	-0.0128277	0.0126758
45	-0.013473	0.0139596
103	-0.0136567	0.0146632
96	-0.0136567	0.0146632
16	-0.0136567	0.0146632
188	-0.0136567	0.0146632
24	-0.0136567	0.0146632
657	-0.0136567	0.0146632
198	-0.0136567	0.0146632
617	-0.0136567	0.0146632
79	-0.0136567	0.0146632
47	-0.0136567	0.0146632
193	-0.0136567	0.0146632
265	-0.0136567	0.0146632
61	-0.0136567	0.0146632
54	-0.0136567	0.0146632
238	-0.0136567	0.0146632
285	-0.0136567	0.0146632
365	-0.0136567	0.0146632
614	-0.0136567	0.0146632
189	-0.0136567	0.0146632
264	-0.0136567	0.0146632
694	-0.0136567	0.0146632

27	-0.0136567	0.0146632
80	-0.0136567	0.0146632
487	-0.0139911	0.0144202
15	-0.0142446	0.0193971
638	-0.0161405	0.063211
50	-0.0192322	0.0128774
555	-0.0232597	0.0493921
602	-0.0249729	0.0587022
140	-0.0255605	0.0625317
66	-0.0255605	0.0625317
6	-0.0255605	0.0625317
25	-0.0255605	0.0625317
12	-0.0255605	0.0625317
293	-0.0255605	0.0625317
65	-0.0255605	0.0625317
323	-0.0255605	0.0625317
166	-0.0255605	0.0625317
305	-0.0255605	0.0625317
205	-0.0255605	0.0625317
77	-0.0264038	0.0587074
48	-0.0264038	0.0587074
545	-0.0264038	0.0587074
493	-0.0264038	0.0587074
1258	-0.0264038	0.0587074
507	-0.0264038	0.0587074
123	-0.0273675	0.0670386
609	-0.0305391	0.0431768
465	-0.0318143	0.0776747

Full spectroscopic data of compound 1

Table S3. NMR data of **1** recorded in MeOD

Position	1				
	δ_C^a , type	δ_H^b m (J in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	202.3, C ^c				
2	50.8, C ^c				
3	46.3, CH	3.49, m	5		5, 12, 13, 14
4	131.3, CH	5.41, m		2, 3, 6, 7, 11, 13	7a, 7b
5	128.1, CH	5.37, ddd(9.9; 4.7; 2.0)	3, 6, 7b	2, 6	3
6	40.1, CH	1.86, m	5, 7b	4, 5, 7, 10	10a, 12
7	43.8, CH ₂	a: 0.87, m b: 1.83, m	7b 5, 6, 7a	4, 6, 8, 9, 11, 16 6, 8, 9, 11	4, 7b, 11 4, 7a, 8
8	34.9, CH	1.53, m	16	6, 7, 9, 16	7b, 10a, 16
9	37.1, CH ₂	a: 1.09, m b: 1.77, m		10 10a	9b 9a, 16
10	29.5, CH ₂	a: 1.06, m b: 2.00, m	9b	6, 9, 11	6, 8, 10b, 12 10a
11	41.6, CH	1.69, m		7	7a
12	14.6, CH ₃	1.45, s		1, 2, 3, 11	3, 6, 10a
13	132.7, CH	5.17, m	14	15	3, 11, 14, 15
14	127.9, CH	5.28, dq(14.7; 6.4)	13, 15	3, 13, 15	3, 13, 15
15	18.2, CH ₃	1.52, m	14	3, 13, 14	13, 14
16	23.1, CH ₃	0.94, d(6.4)	8	7, 8, 9	8, 9b
1'	NH				
2'	C, nd				
3'	C, nd				
4'	C, nd				
5'	67.3, CH ^c	3.69, m	6'		6', 7'
6'	68.1, CH	4.06, qd(6.5; 3.1)	5', 7'	7'	5', 7'
7'	20.6, CH ₃	1.29, d(6.6)	6'	6'	5', 6'

^a recorded at 125 MHz, ^b recorded at 500 MHz, ^c δ_C determined by 2D experiments, nd: not determined

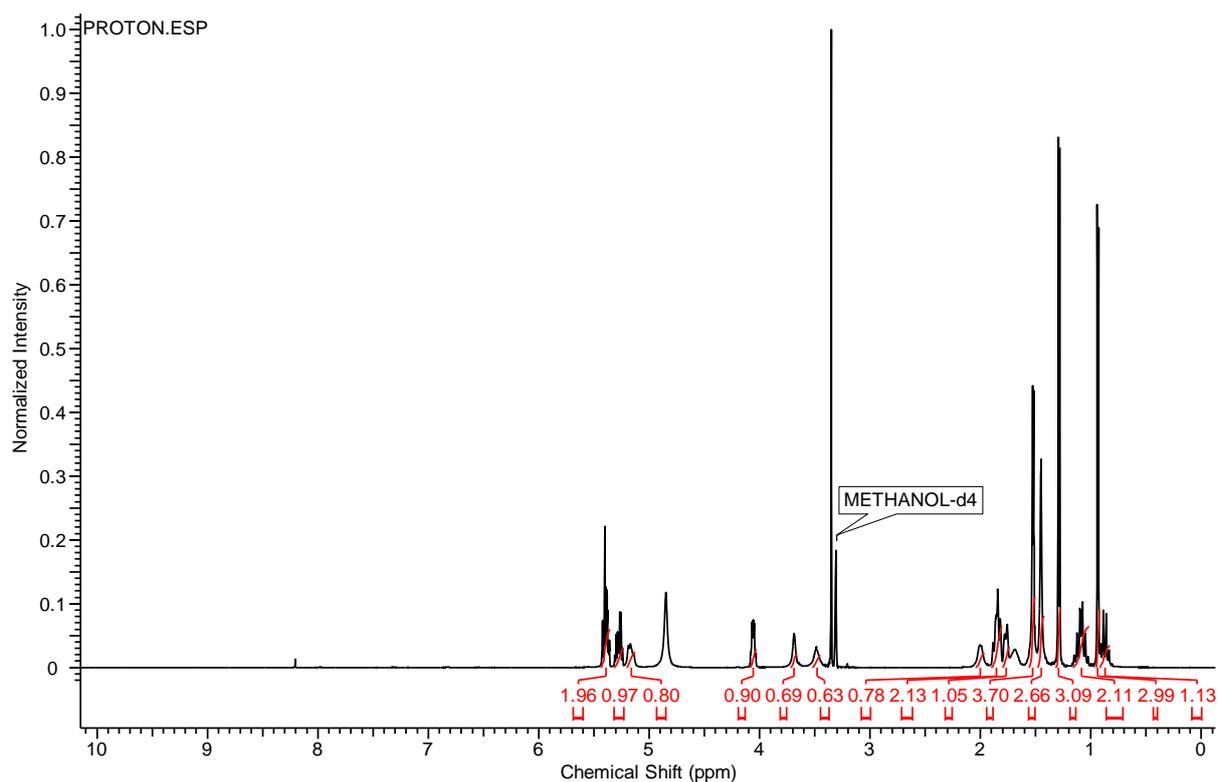


Figure S2. ^1H NMR spectrum of **1** recorded at 500MHz in MeOD

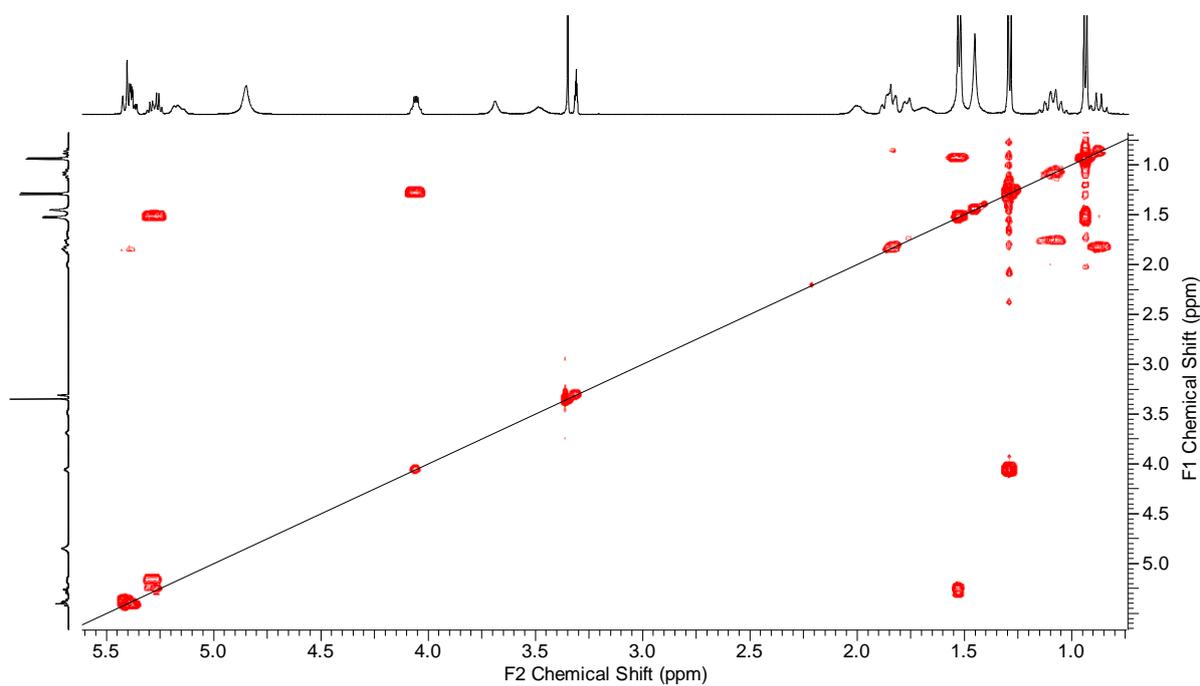


Figure S3. COSY spectrum of **1** recorded at 500MHz in MeOD

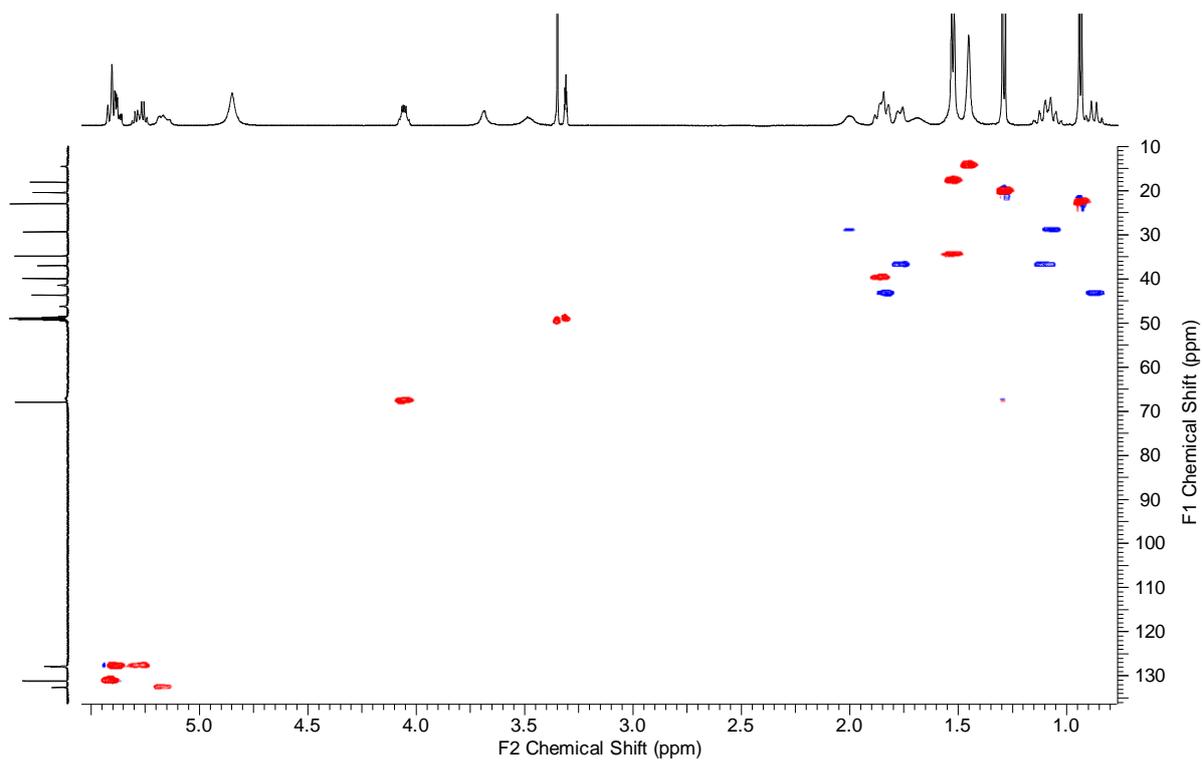


Figure S4. HSQC spectrum of **1** recorded at 500MHz in MeOD

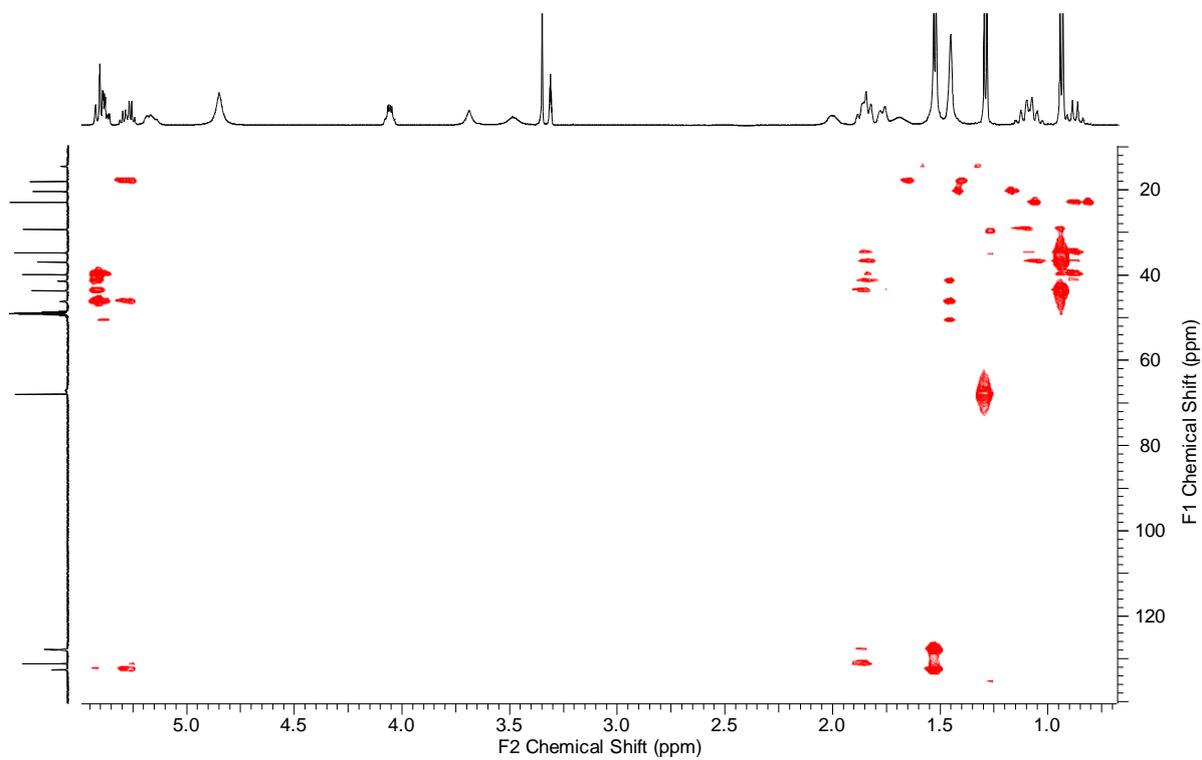


Figure S5. HMBC spectrum of **1** recorded at 500MHz in MeOD

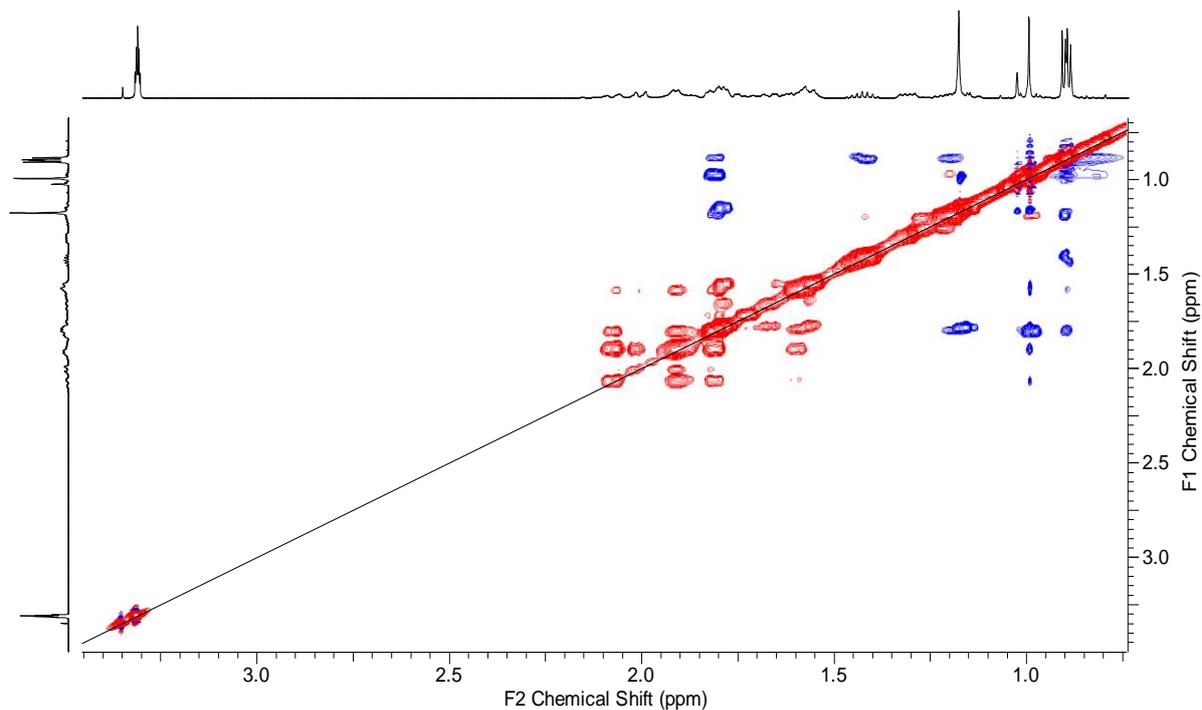


Figure S6. NOESY spectrum of **1** recorded at 500MHz in MeOD

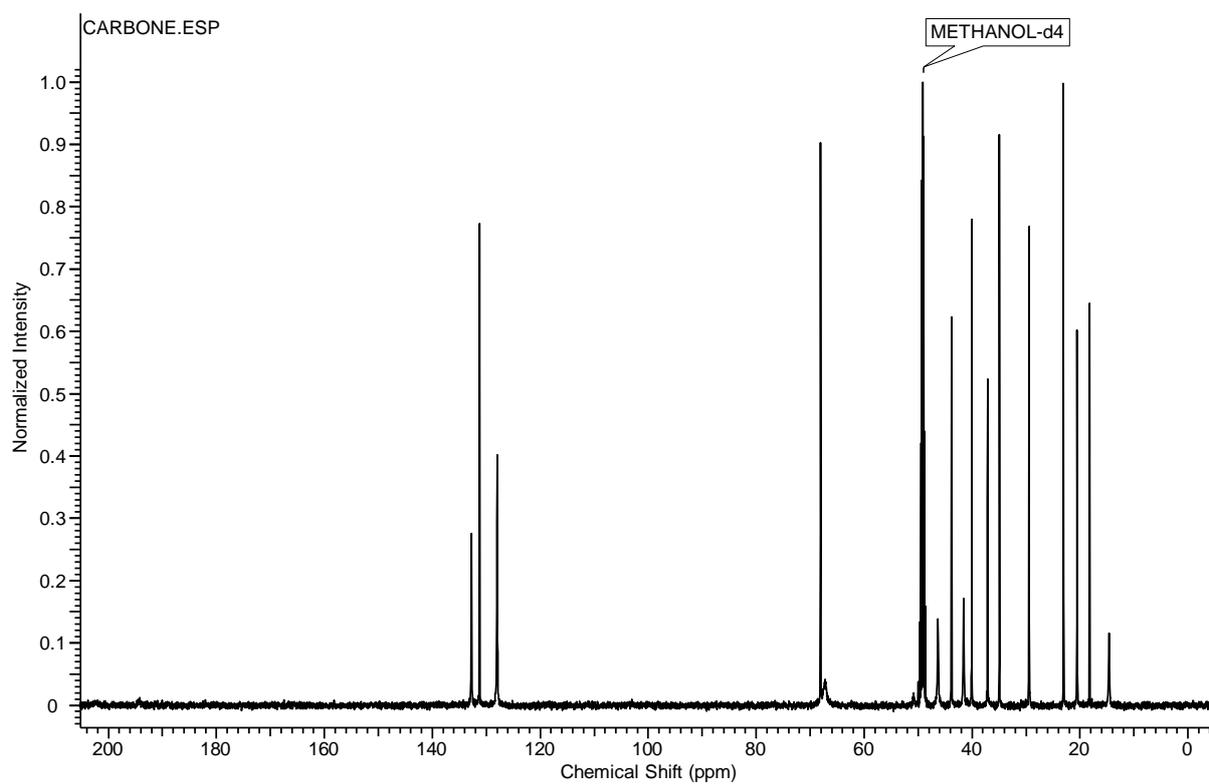


Figure S7. ^{13}C spectrum of **1** recorded at 125 MHz in MeOD

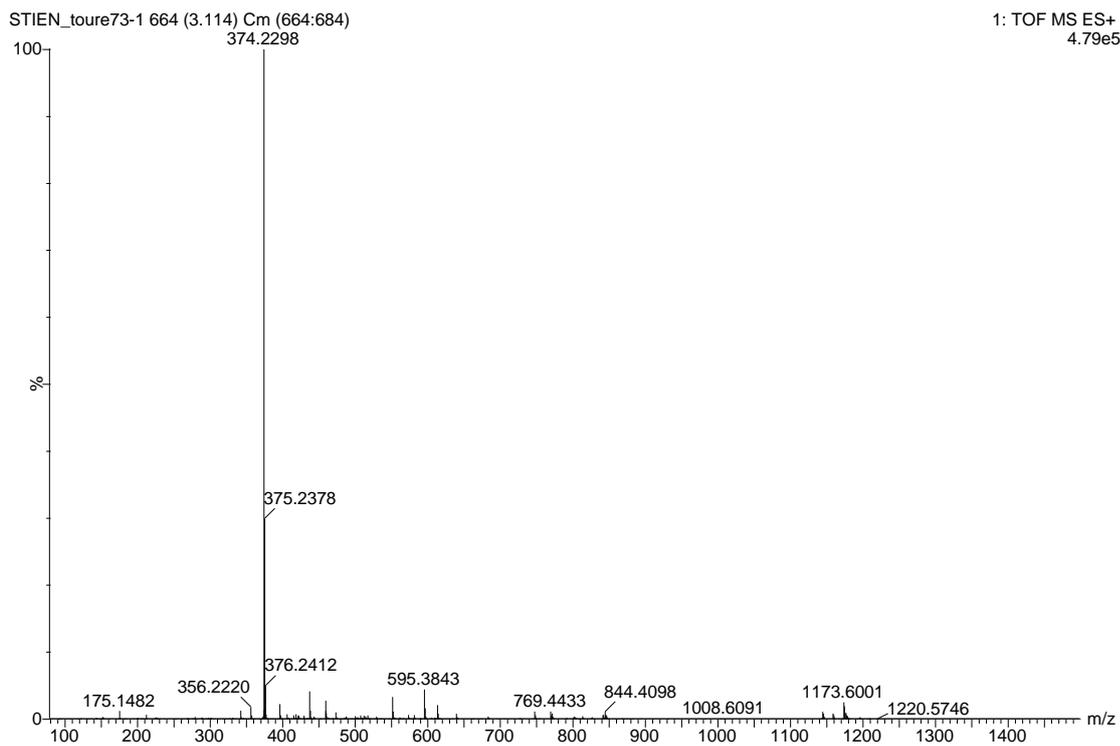


Figure S8. Mass spectrum of **1**

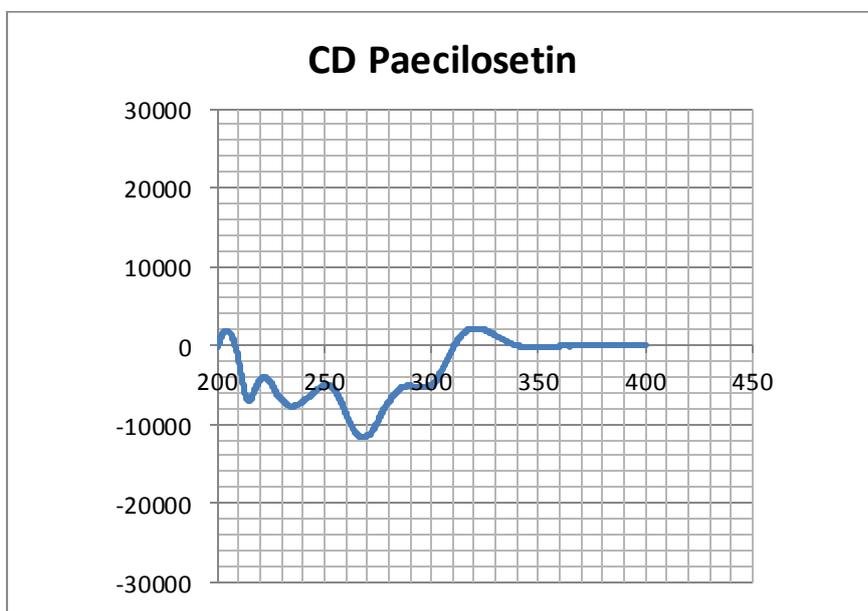


Figure S9. CD spectrum of **1**

Full spectroscopic data of compound **2**

Table S4. NMR data of **2** recorded in MeOD

2					
Position	δ_c^a , type	δ_H^b m (f in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	203.4, C ^c				
2	51.9, C ^c				
3	45.7, CH	3.72, m		5	4, 5, 12
4	131.1, CH	5.37, m	6	6, 11	3, 6
5	128.9, CH	5.35, m	6		3, 6, 12
6	40.1, CH	1.81, m	4, 5, 7a	4, 5, 7	4, 5, 7a, 8, 12
7	44.0, CH ₂	a: 0.84, m	6, 7b, 8	6, 8	7b
		b: 1.80, m	7a	9	7a, 8
8	35.0, CH	1.50, m	7b, 16		6, 7b
9	37.3, CH ₂	a: 1.09, m			9b
		b: 1.72, m			9a
10	29.3, CH ₂	a: 0.96, m			12
		b: 1.92, m			
11	41.8, CH	1.68, m			
12	15.0, CH ₃	1.40, s		1, 2, 3, 11	3, 5, 6, 10a
13	133.9, CH	5.16, m	14		15
14	126.6, CH	5.26, dq(14.9 ; 6.3)	13, 15	3, 13, 15	15
15	18.2, CH ₃	1.49, m	14	13, 14	13, 14
16	23.1, CH ₃	0.92, d(6.4)	8	7, 8, 9	
1'	NH				
2'	C, nd				
3'	C, nd				
4'	192.6, C ^c				
5'	66.2, CH	3.77, m	6'	6', 7'	6', 7'
6'	69.6, CH	4.06, m	5', 7'		5', 7'
7'	16.8, CH ₃	1.03, d(6.3)	6'	5', 6'	5', 6'

^a recorded at 200 MHz, ^b recorded at 600 MHz, ^c δ_c determined by 2D experiments, nd: not determined

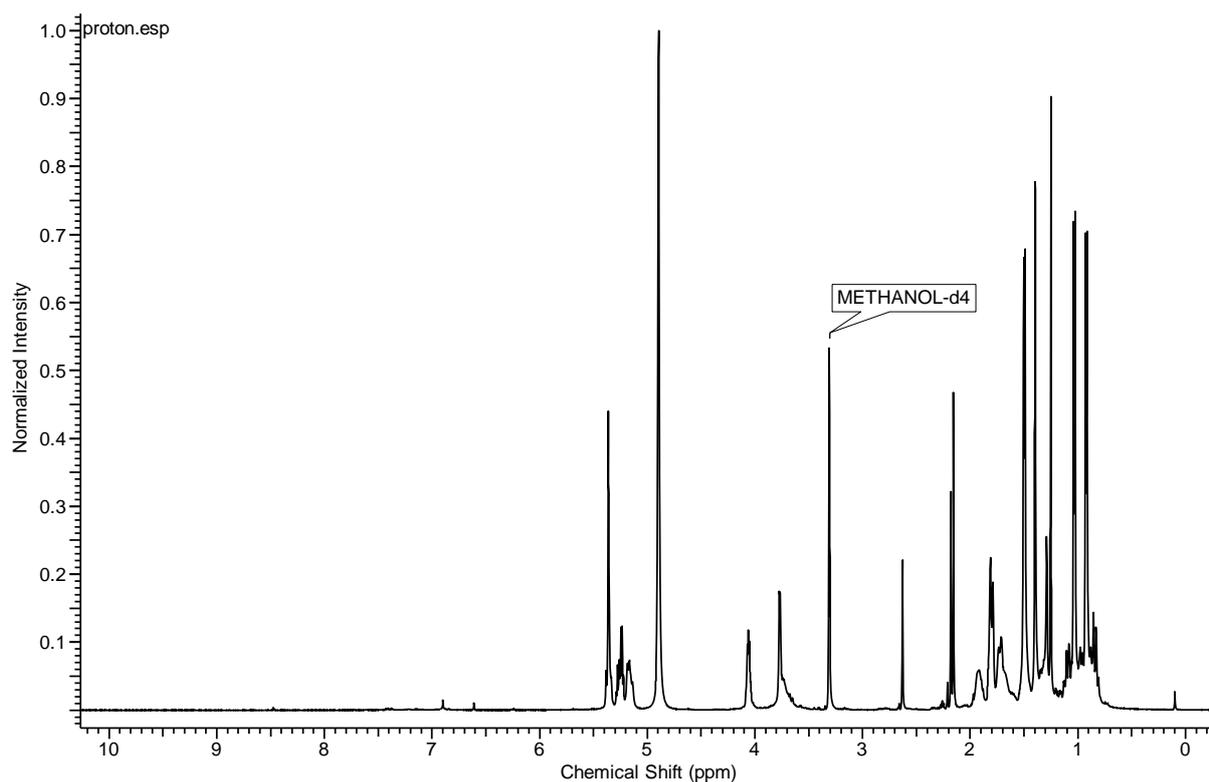


Figure S10. ^1H NMR spectrum of **2** recorded at 600MHz in MeOD

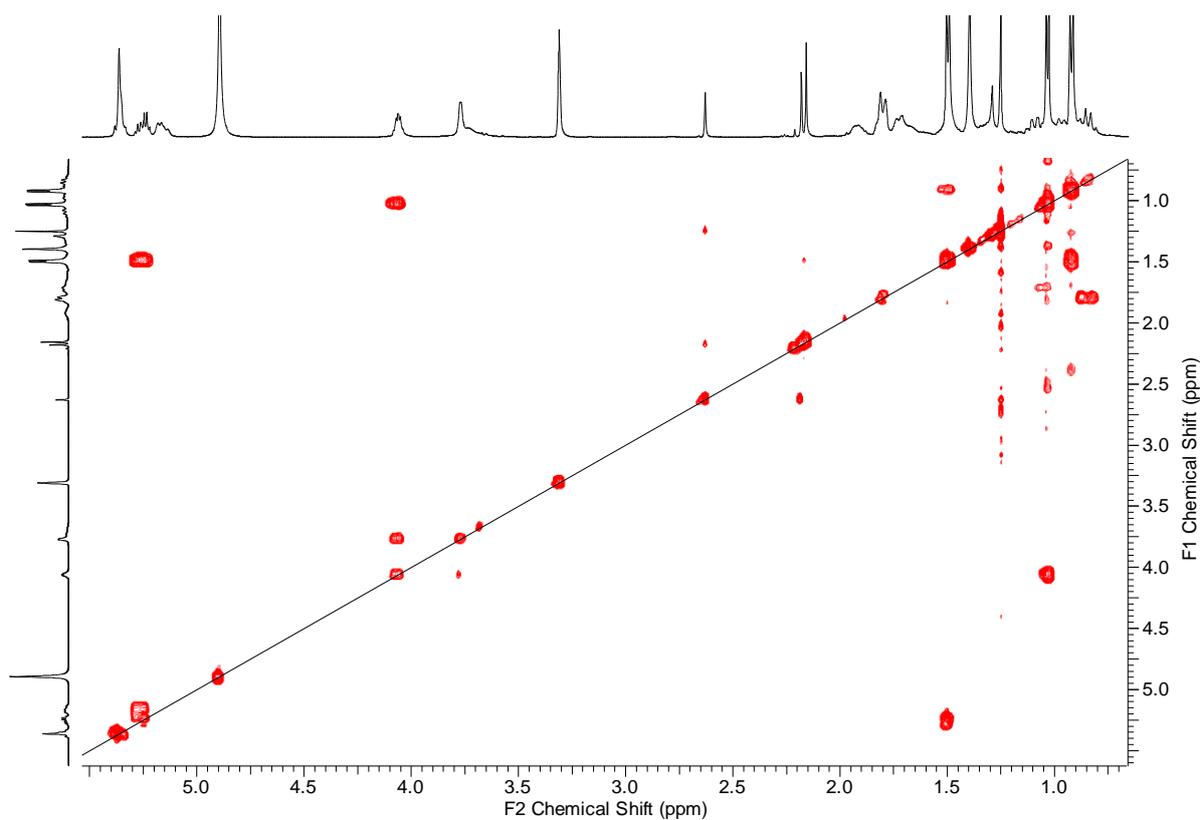


Figure S11. COSY spectrum of **2** recorded at 600MHz in MeOD

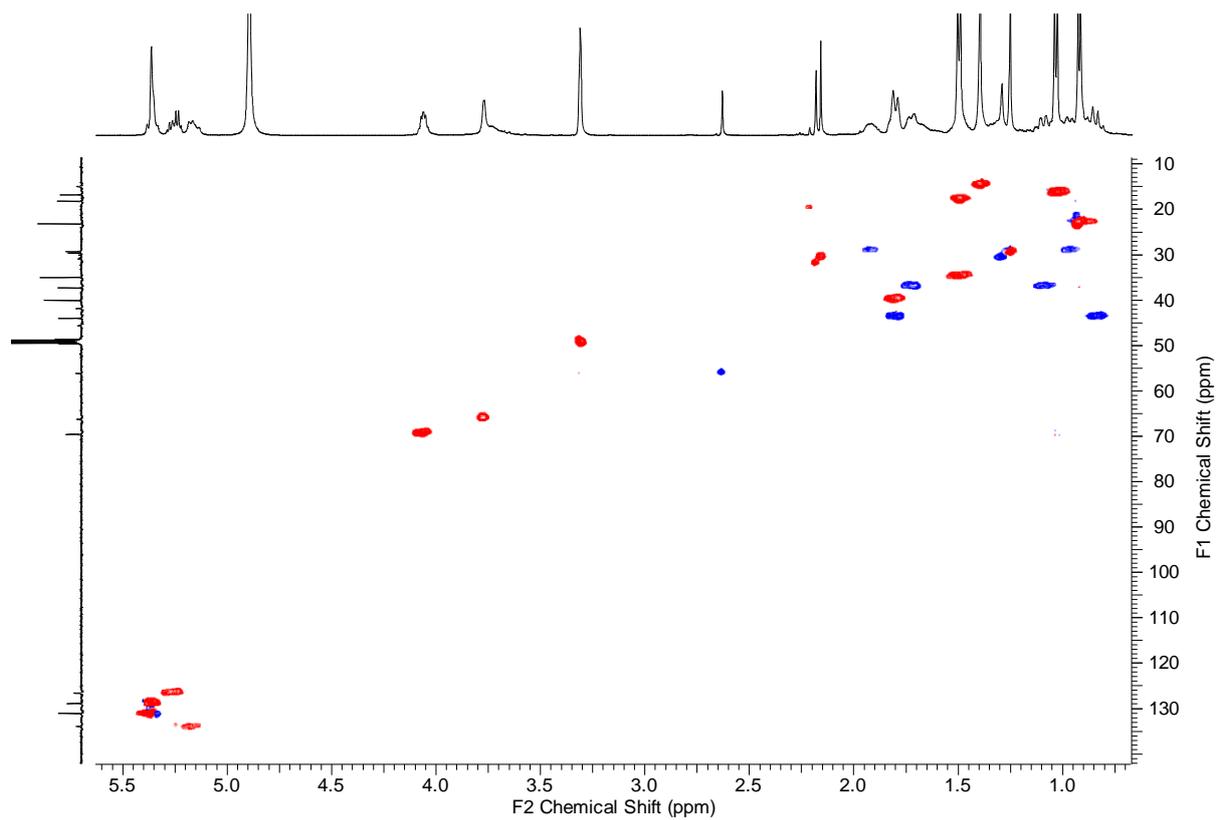


Figure S12. HSQC spectrum of **2** recorded at 600MHz in MeOD

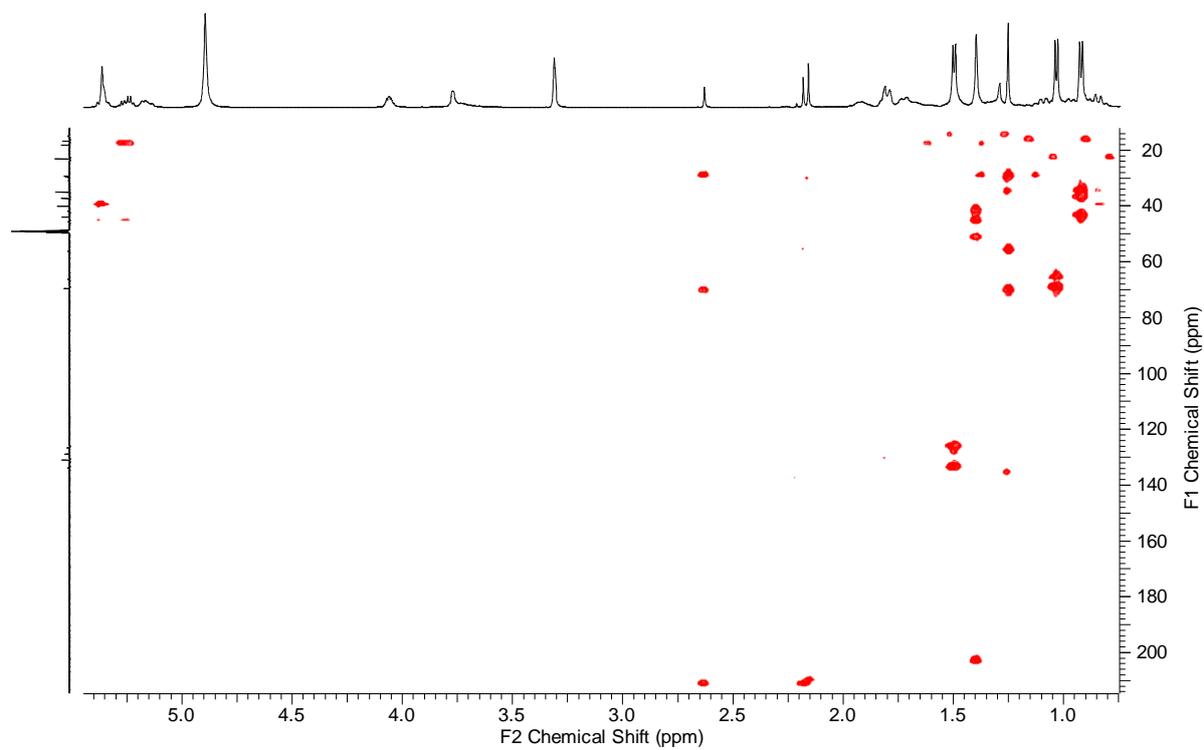


Figure S13. HMBC spectrum of **2** recorded at 600MHz in MeOD

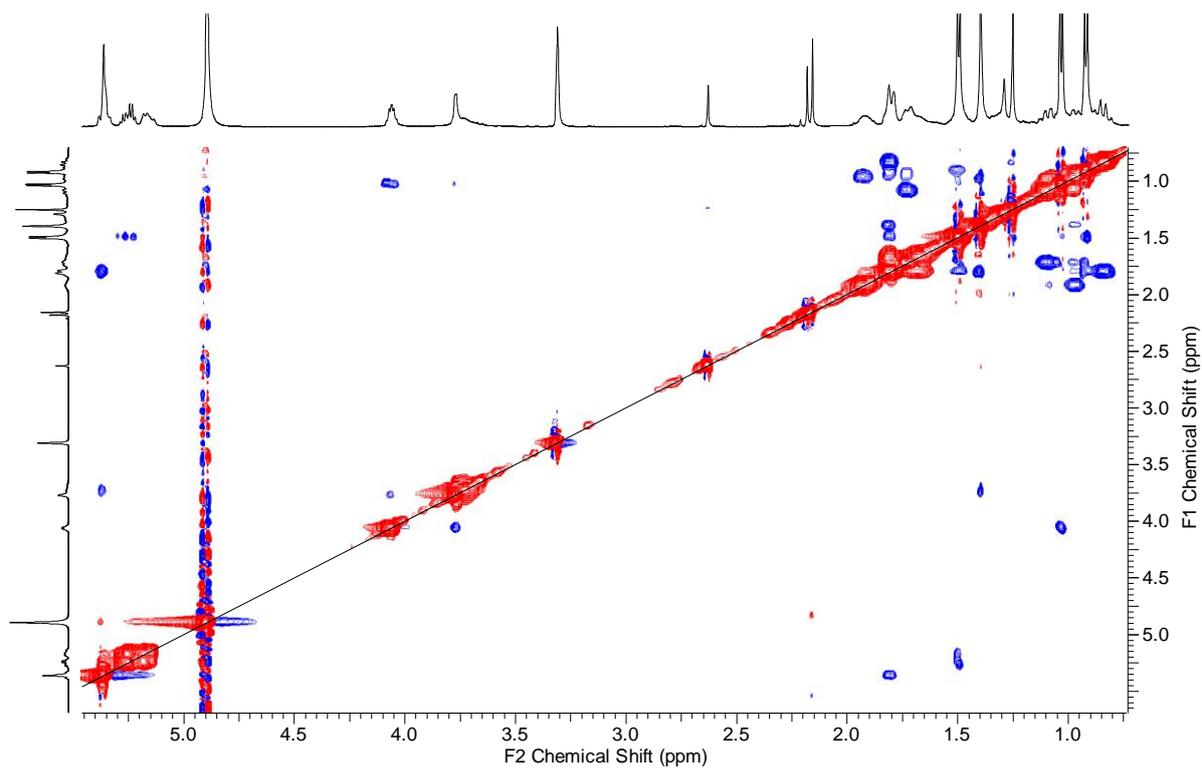


Figure S14. NOESY spectrum of **2** recorded at 600MHz in MeOD

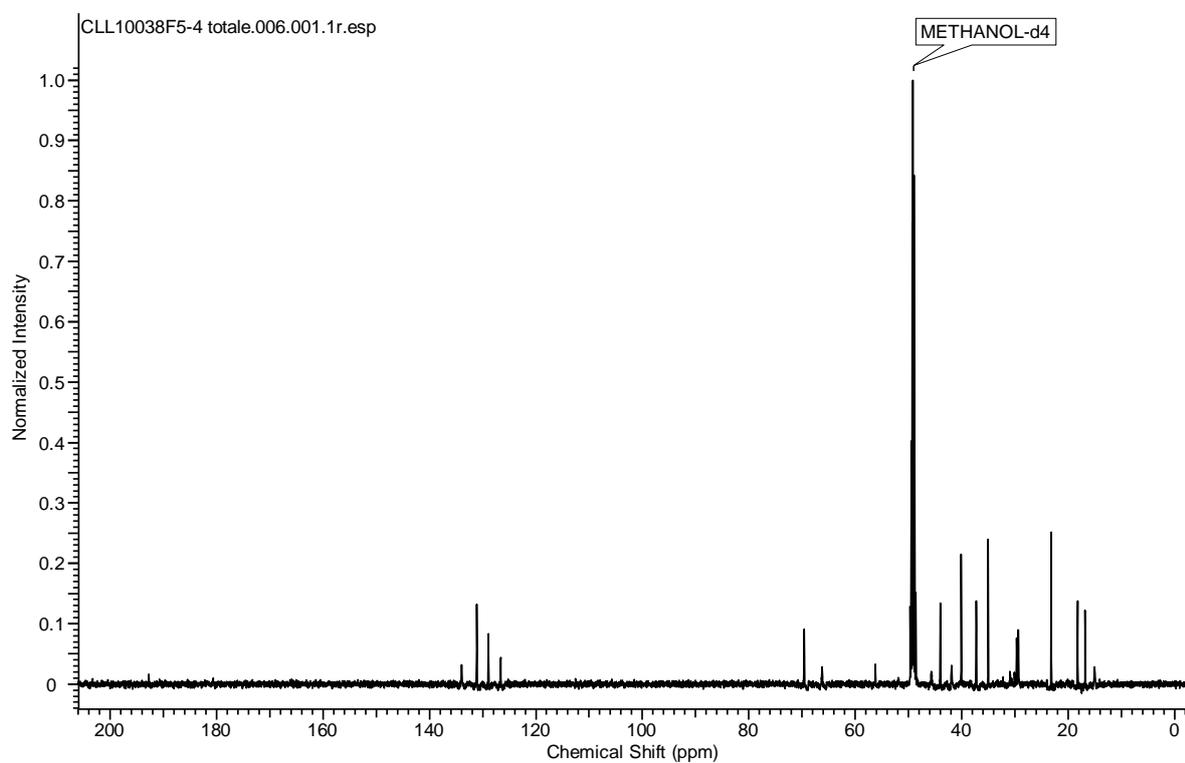


Figure S15. ^{13}C spectrum of **2** recorded at 200MHz in MeOD

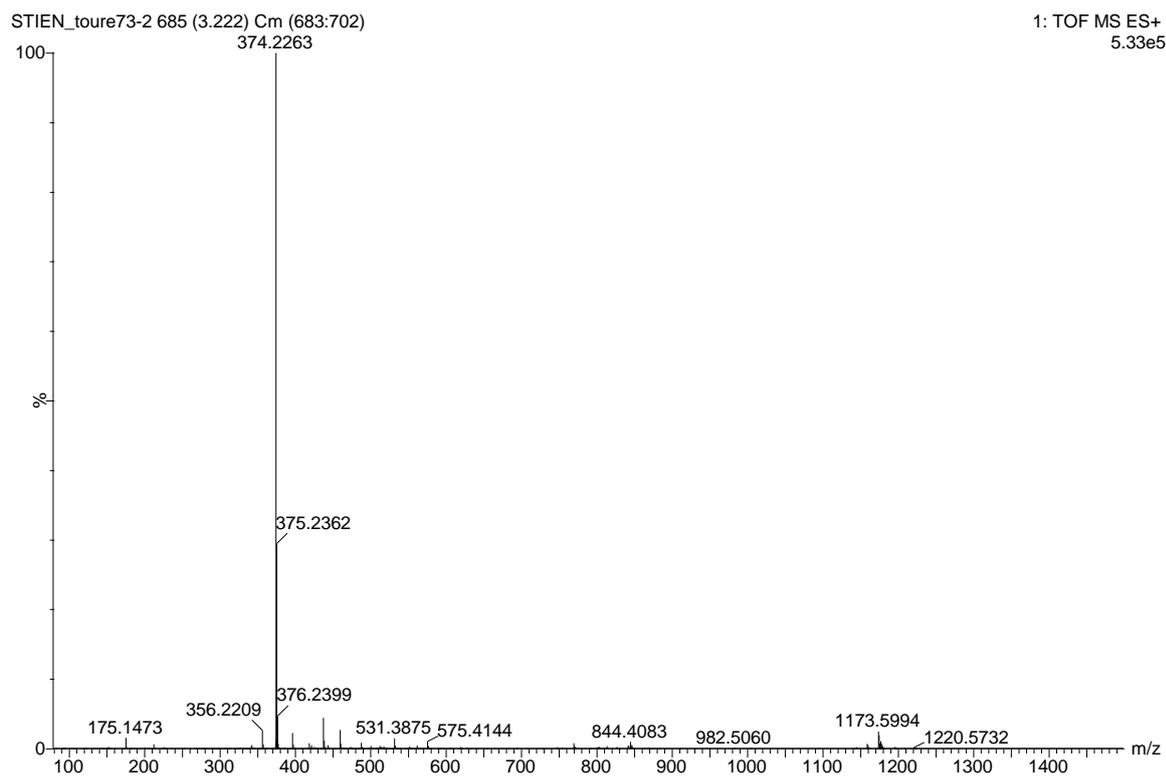


Figure S16. Mass spectrum of **2**.

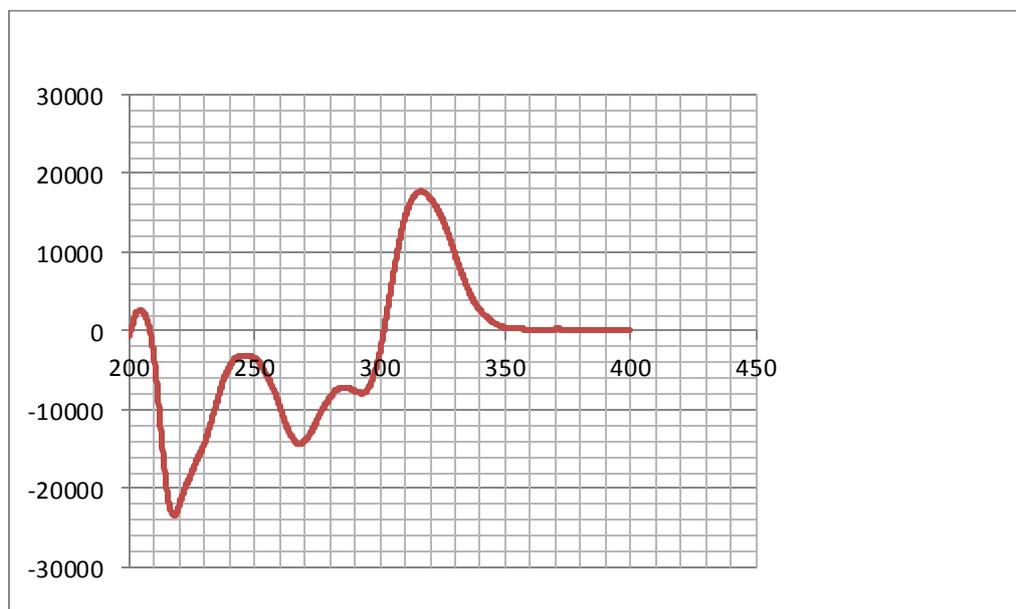


Figure S17. CD spectrum of **2**.

Full spectroscopic data of compound 3

Table S5. NMR data of **3** recorded in MeOD

3					
position	δ_C^a , type	δ_H^b m (J in Hz)	COSY	HMBC	ROESY
1	204.1, C ^c				
2	52.5, C ^c				
3	45.4, CH	4.01, m	4, 5		
4	130.9, CH	5.39, m	3	2, 6	
5	129.4, CH	5.38, m	3	3, 11	7b
6	39.7, CH	1.80, m	7a		
7	38.4, CH ₂	a: 0.90, m b: 1.95, m	6, 7b, 8 7a, 8		7b 5, 7a
8	42.8, CH	1.58, m	7a, 7b, 16a, 16b		16a
9	30.9, CH ₂	1.29, m			
10	29.3, CH ₂	a: 0.91, m b: 2.03, m	10b, 11 10a		
11	42.3, CH	1.76, m	10a		12
12	15.3, CH ₃	1.38, s		1, 2, 3, 11	11
13	134.3, CH	5.16, dd (14.5, 9.2)	14		
14	126.6, CH	5.28, dq (14.6, 6.5)	13, 15	3, 15	
15	18.3, CH ₃	1.41, m	14		
16	69.1, CH ₂	a: 3.37, m b: 3.43, dd (10.5, 5.8)	8 8	7 7	8
1'	NH				
2'	134.1, C ^c				
3'	127.0, C ^c				
4'	198.6, C ^c				
5'	65.6, CH	3.52, m		4'	7'
6'	68.7, CH	4.08, m	7'		
7'	19.8, CH ₃	1.25, d (6.1)	6'	2', 3', 5', 6'	5'

^a recorded at 200 MHz, ^b recorded at 600 MHz, ^c δ_C determined by 2D experiments, nd: not determined

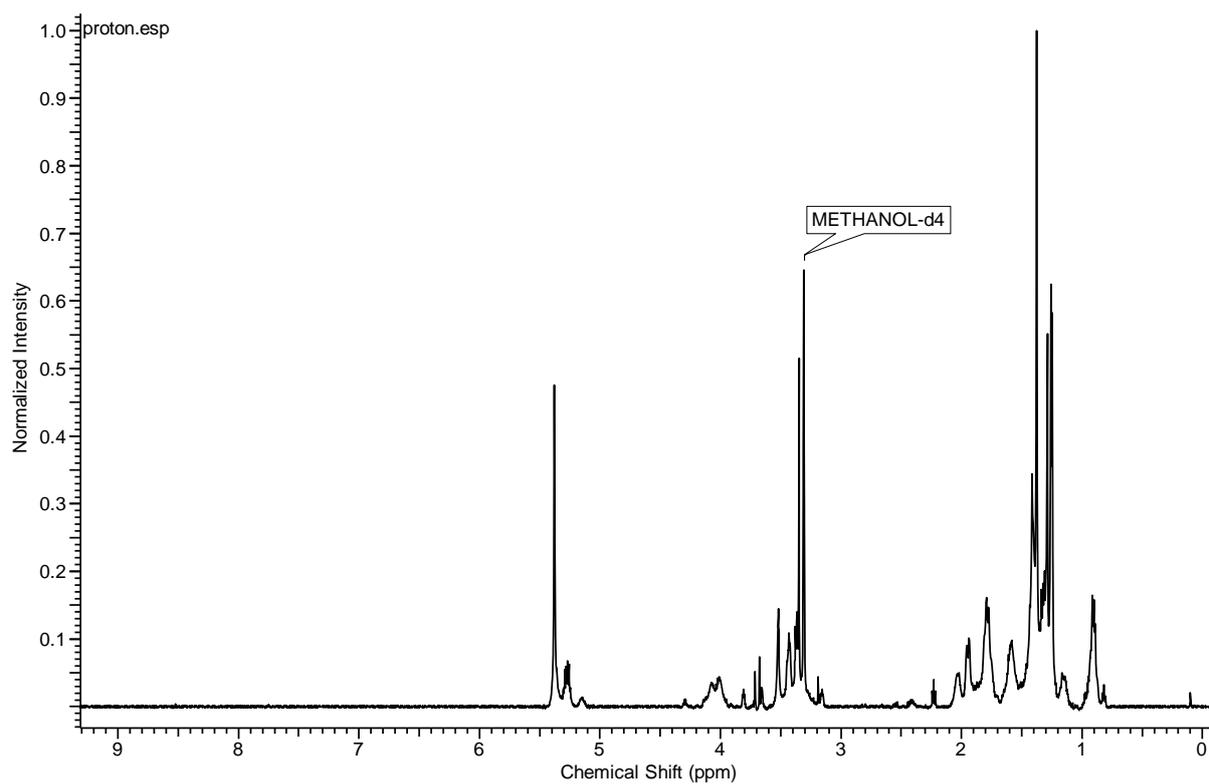


Figure S18. ^1H spectrum of **3** recorded at 600MHz in MeOD

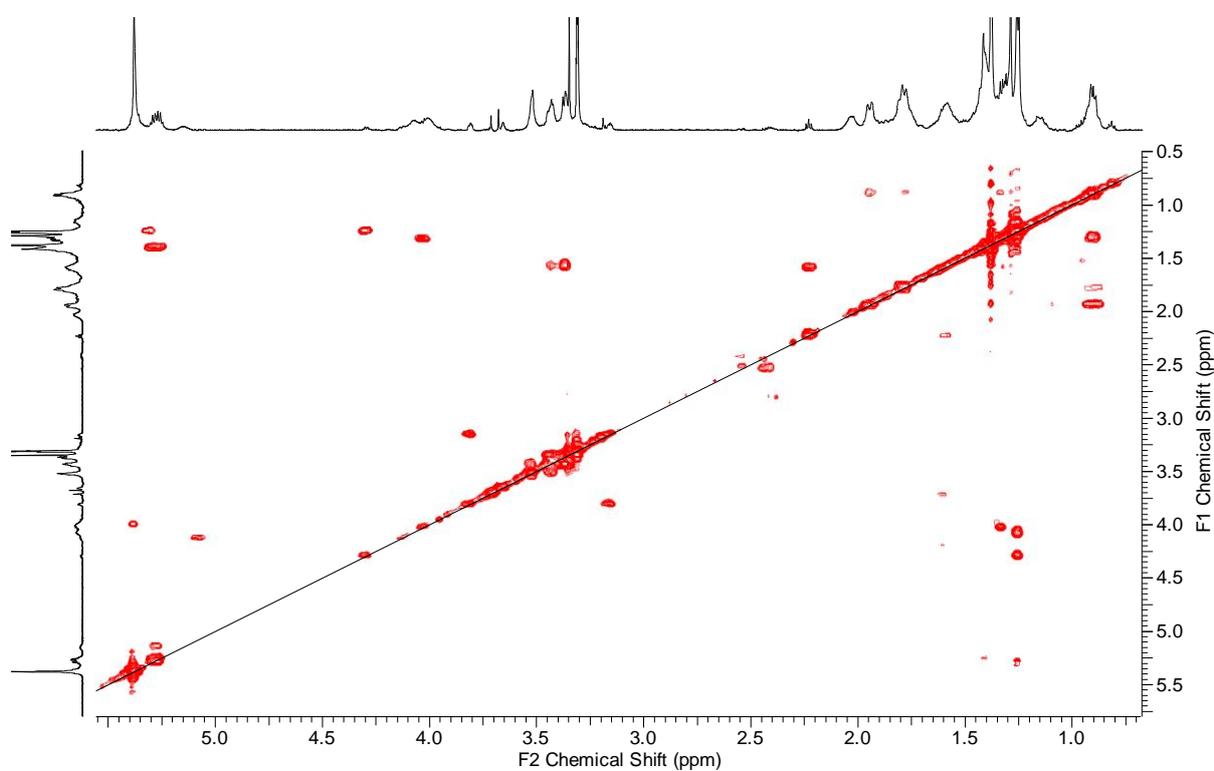


Figure S19. COSY spectrum of **3** recorded at 600MHz in MeOD

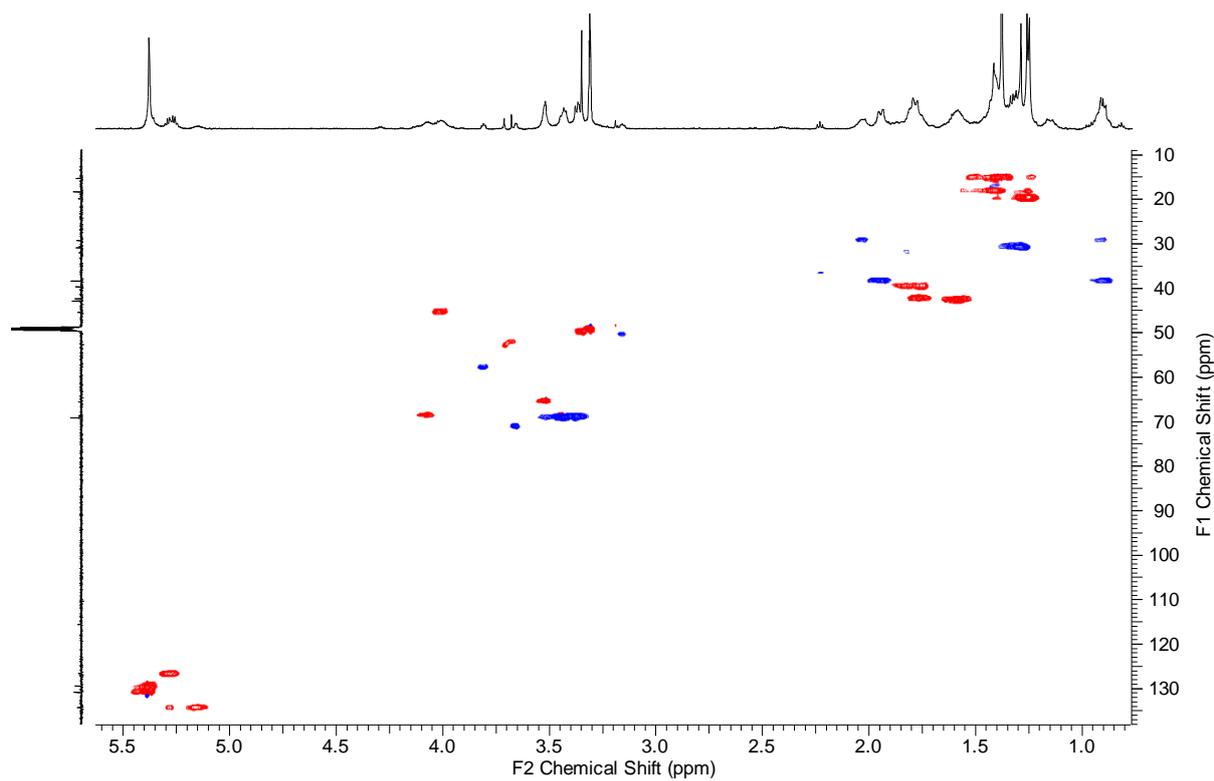


Figure S20. HSQC spectrum of **3** recorded at 600MHz in MeOD

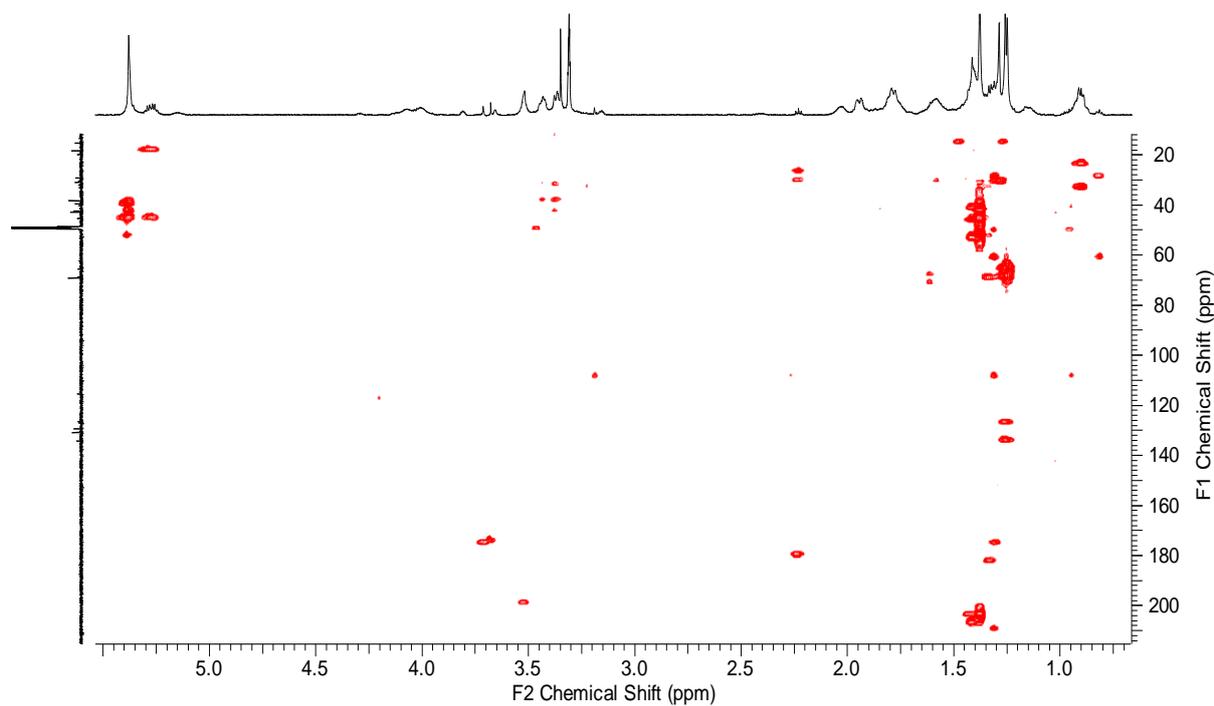


Figure S21. HMBC spectrum of **3** recorded at 600MHz in MeOD

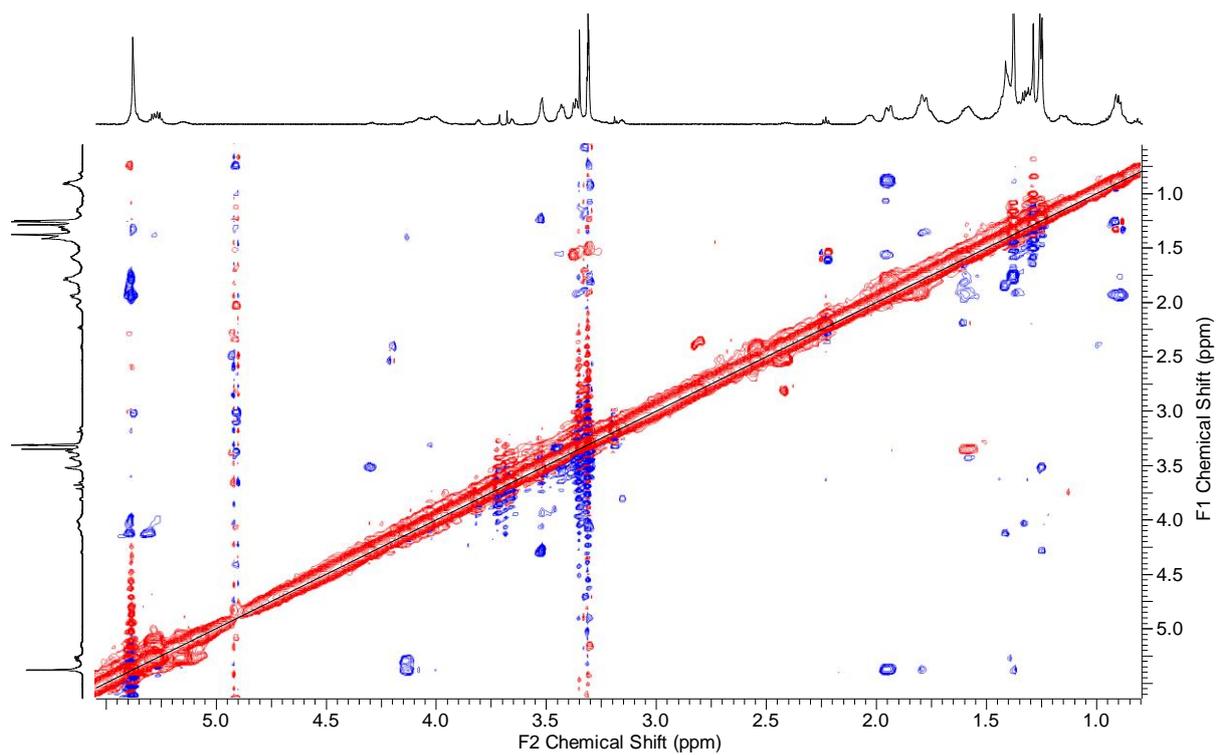


Figure S22. NOESY spectrum of **3** recorded at 600MHz in MeOD

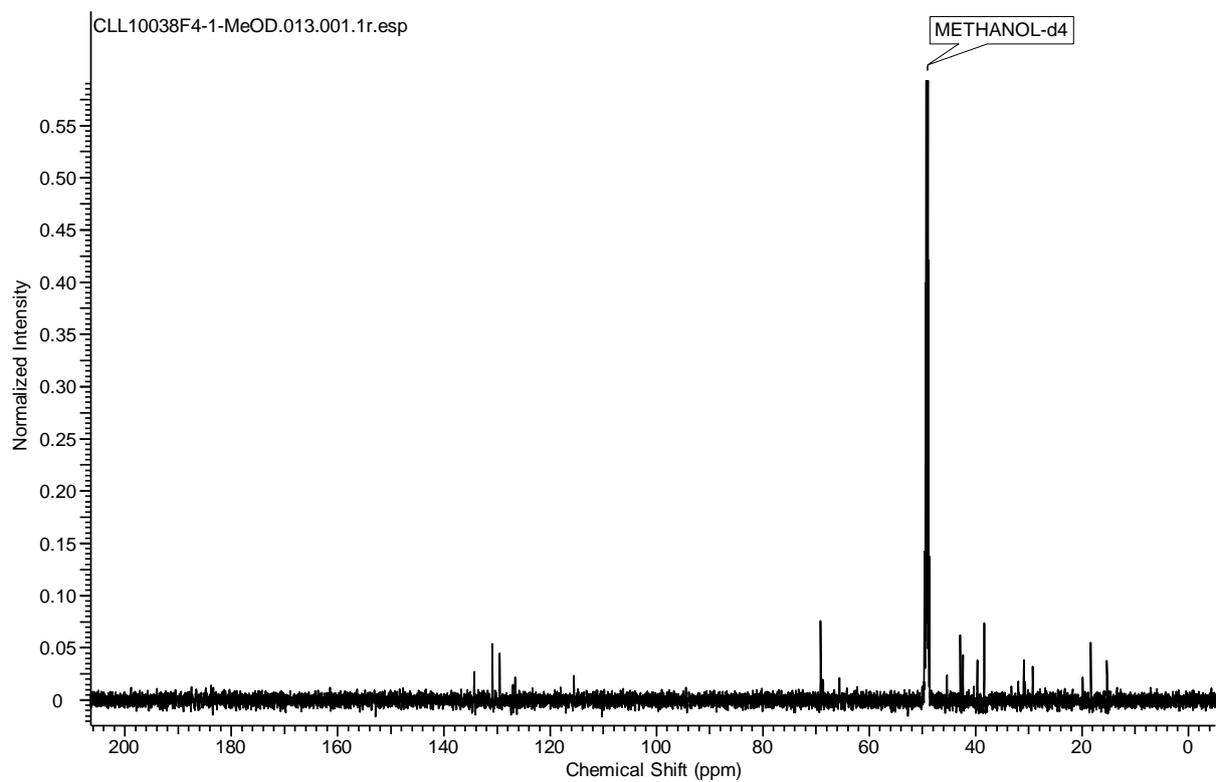


Figure S23. ^{13}C spectrum of **3** recorded at 200MHz in MeOD

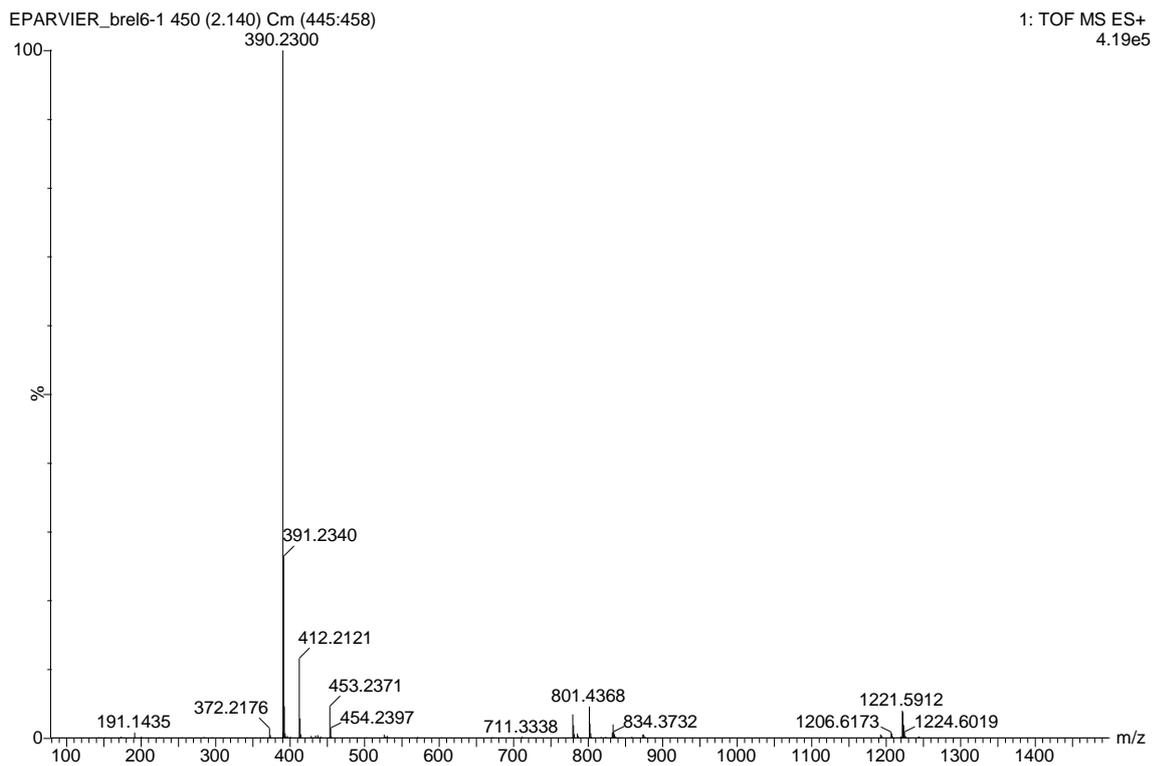


Figure S24. Mass spectrum of **3**.

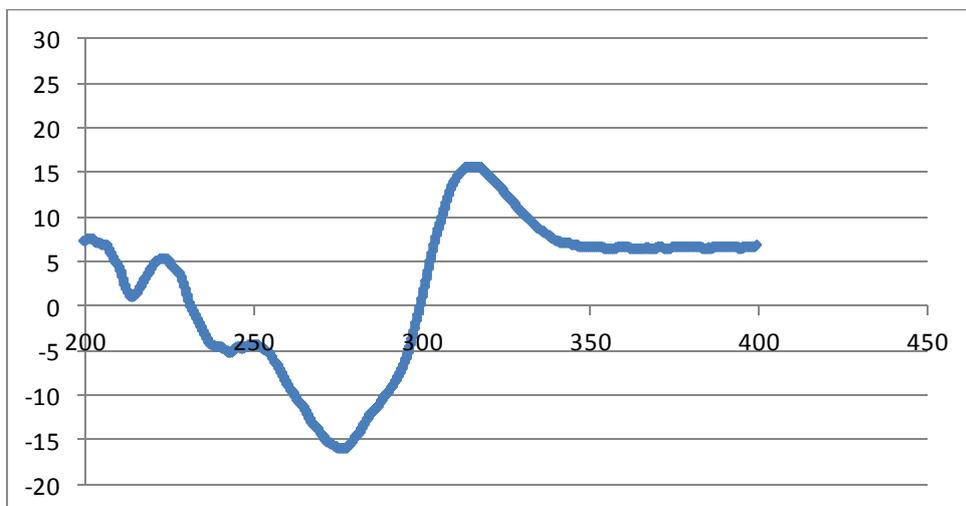


Figure S25. CD spectrum of **3**.

Full spectroscopic data of compound **4**

Table S6. NMR data of **4** recorded in MeOD

4				
position	δ_c^a , type	δ_H^b m (J in Hz)	COSY	HMBC
1	204.2, C ^c			
2	52.5, C ^c			
3	45.5, CH ^c	3.95, m	4, 5, 13	
4	131.0, CH	5.41, m	3	3, 6
5	129.3, CH	5.39, m	3, 6	
6	39.8, CH	1.81, m	5, 7a	
7	38.4, CH ₂	a: 0.85, m b: 1.92, m	6, 7b, 8 7a	
8	42.7, CH	1.59, m	7a, 16	
9	29.3, CH ₂ ^c	1.33, m		
10	27.1, CH ₂ ^c	a: 0.97, m b: 2.03, m		
11	42.4, CH ^c	1.72, m		
12	15.3, CH ₃ ^c	1.40, s		1, 2, 3, 11
13	134.2, CH ^c	5.19, m	3, 14, 15	15
14	126.5, CH ^c	5.28, dq(21.0 ; 6.1)	13, 15	3, 15
15	18.4, CH ₃	1.51, d(5.6)	13, 14	13, 14
16	69.0, CH ₂	3.38, m	8	
1'	NH			
2'	C, nd			
3'	C, nd			
4'	C, nd			
5'	138.1, C ^c			
6'	103.7, CH ^c	5.51, q(7.5)	7'	
7'	12.1, CH ₃ ^c	1.77, d(7.5)	6'	5', 6'

^a recorded at 200 MHz, ^b recorded at 600 MHz, ^c δ_c determined by 2D experiments, nd: not determined

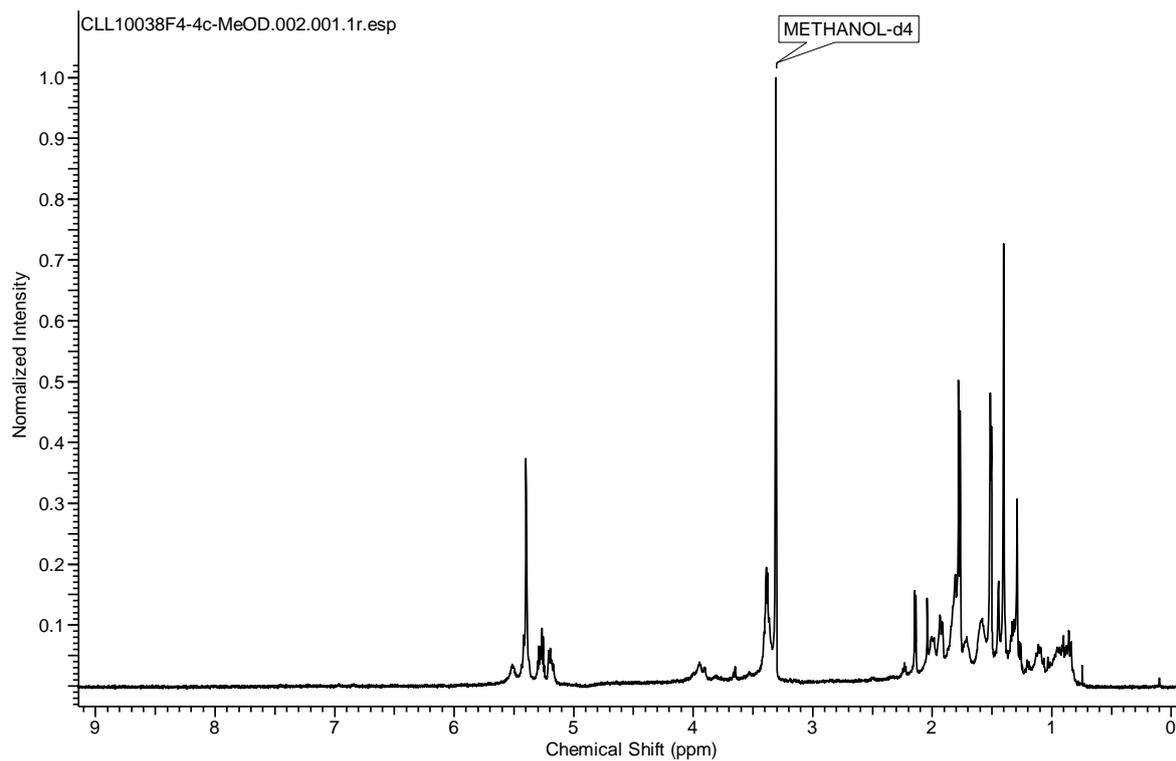


Figure 26. ^1H NMR data of compound **4** recorded in MeOD at 600MHz

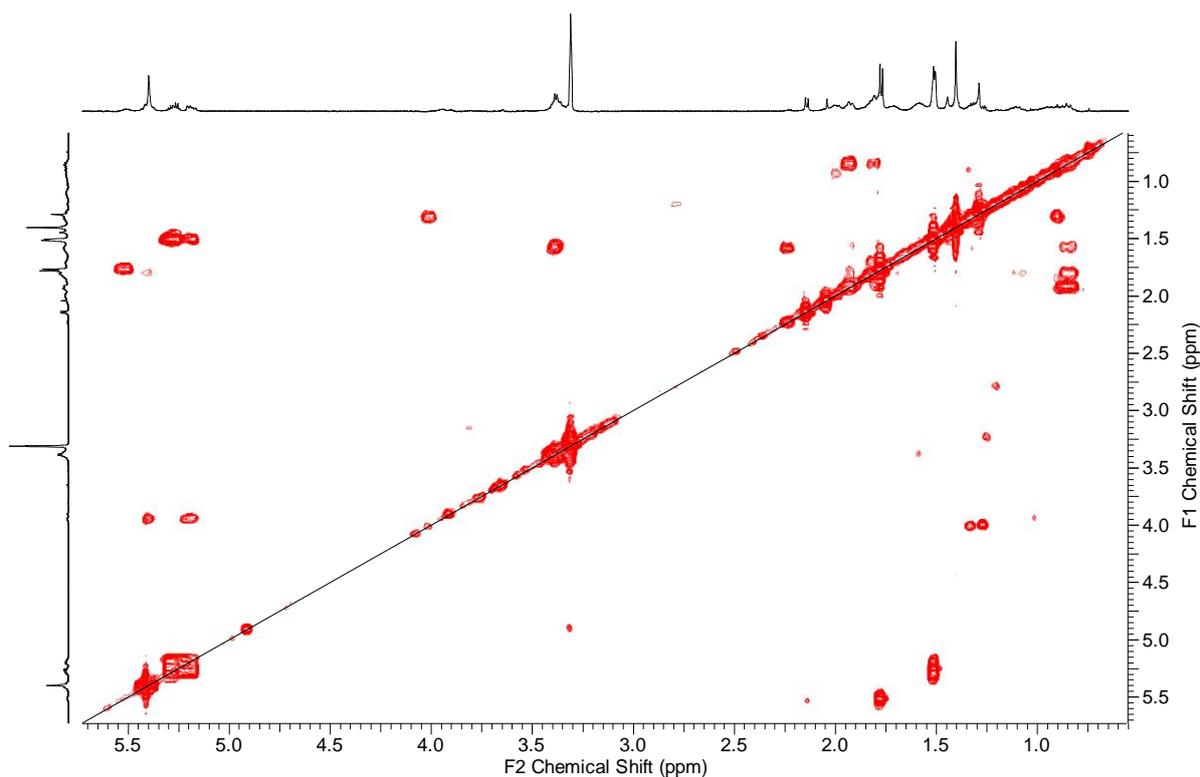


Figure 27. COSY spectrum of compound **4** recorded in MeOD at 600MHz

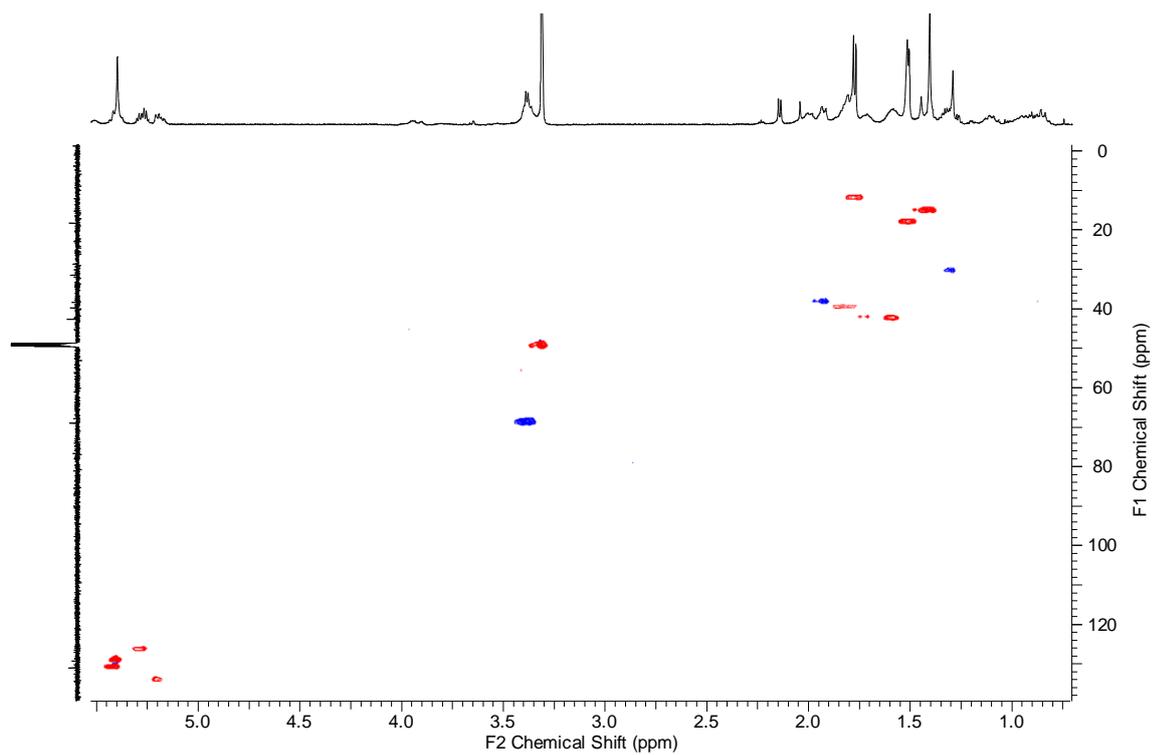


Figure 28. HSQC spectrum of compound **4** recorded in MeOD at 600MHz

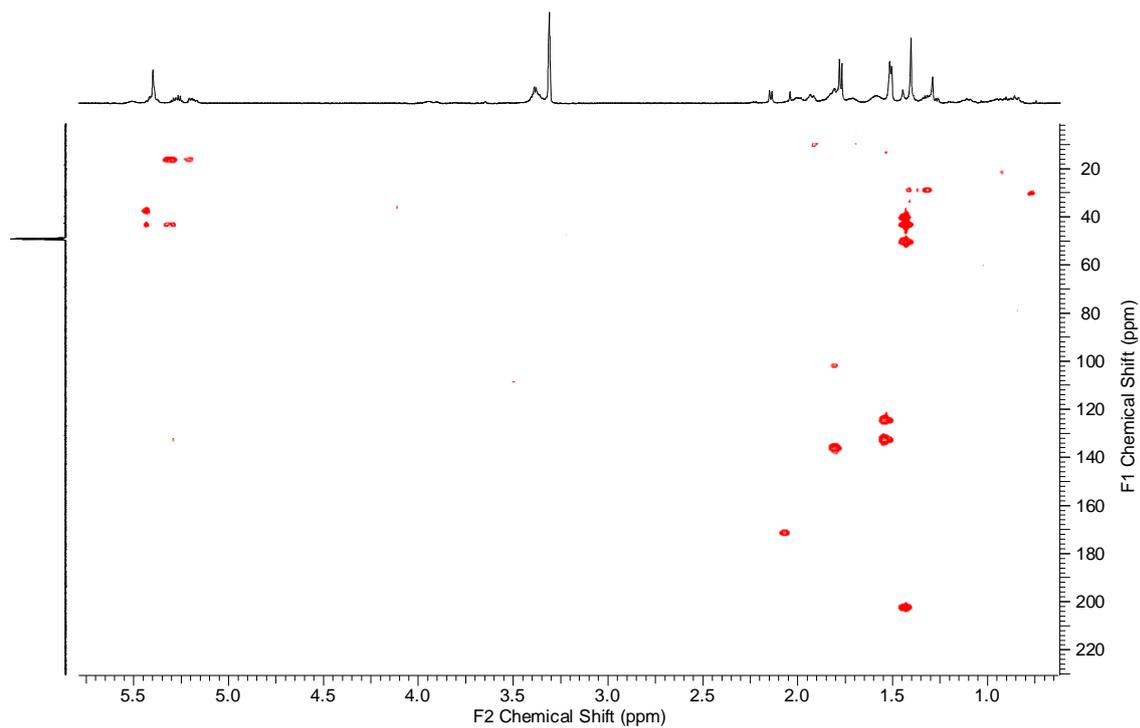


Figure 29. HMBC spectrum of compound **4** recorded in MeOD at 600MHz

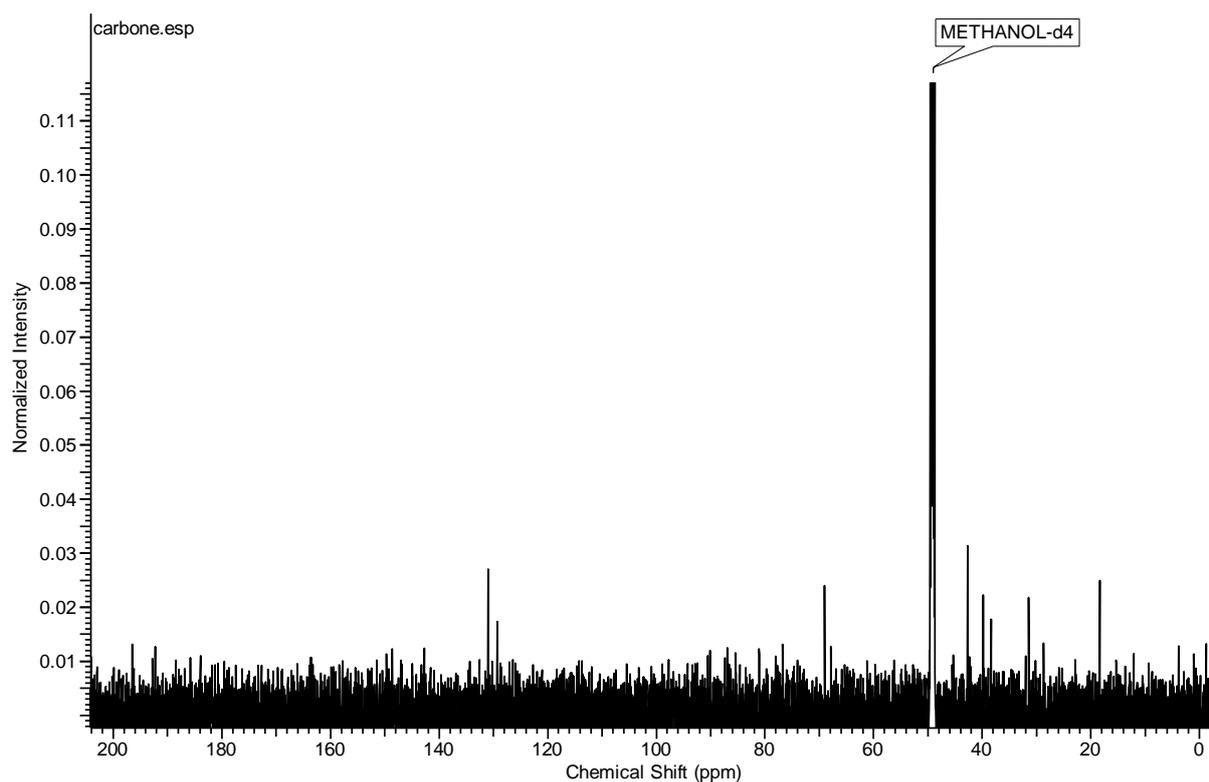


Figure 30. ^{13}C spectrum of compound **4** recorded in MeOD at 200MHz

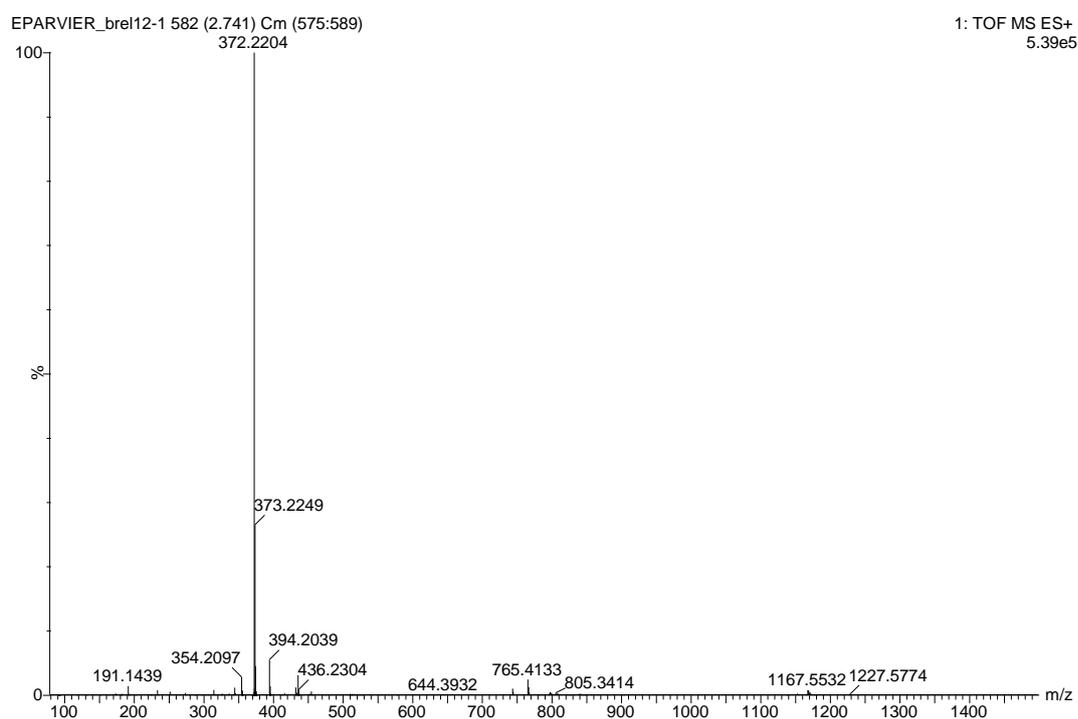


Figure S31. Mass spectrum of **4**.

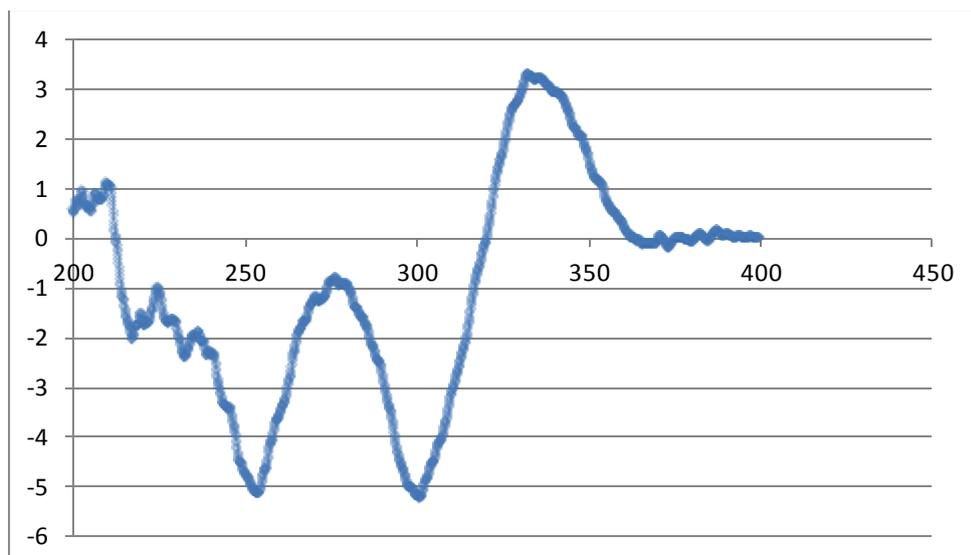


Figure S32. CD spectrum of **4**.

Full spectroscopic data of compound 5

Table S7. NMR data of **5** recorded in MeOD

5				
position	δ_C^a , type	δ_H^b m (J in Hz)	COSY	HMBC
1	203.7, C ^c			
2	52.1, C ^c			
3	44.7, CH ^c	4.08, m	4, 13	
4	129.2, CH	5.35, m	3, 5	6
5	131.0, CH	5.34, m	4	6, 11
6	40.4, CH	1.74		
7	44.2, CH ₂	a: 0.78 b: 1.75	7b 7a	
8	35.0, CH	1.41	16	
9	30.9, CH ₂	1.29		
10	29.8, CH ₂	a: 0.80 b: 1.80		
11	42.2, CH	1.62		
12	14.9, CH ₃ ^c	1.36, s		1, 2, 3, 11
13	134.5, CH ^c	5.21, dd (15.1 ; 8.6)	3, 15	15
14	126.0, CH ^c	5.26, dq (8.8 ; 6.1)	15	15
15	18.5, CH ₃	1.50, d (6.0)	13, 14	13, 14
16	23.2, CH ₃	0.84, m	8	
1'	NH			
2'	C, nd			
3'	C, nd			
4'	C, nd			
5'	132.8, C ^c			
6'	102.3, CH ^c	5.48, q (7.5)	7'	
7'	11.9, CH ₃	1.76, d (7.5)	6'	5', 6'

recorded at 200 MHz, ^b recorded at 600 MHz, ^c δ_C determined by 2D experiments, nd: not determined

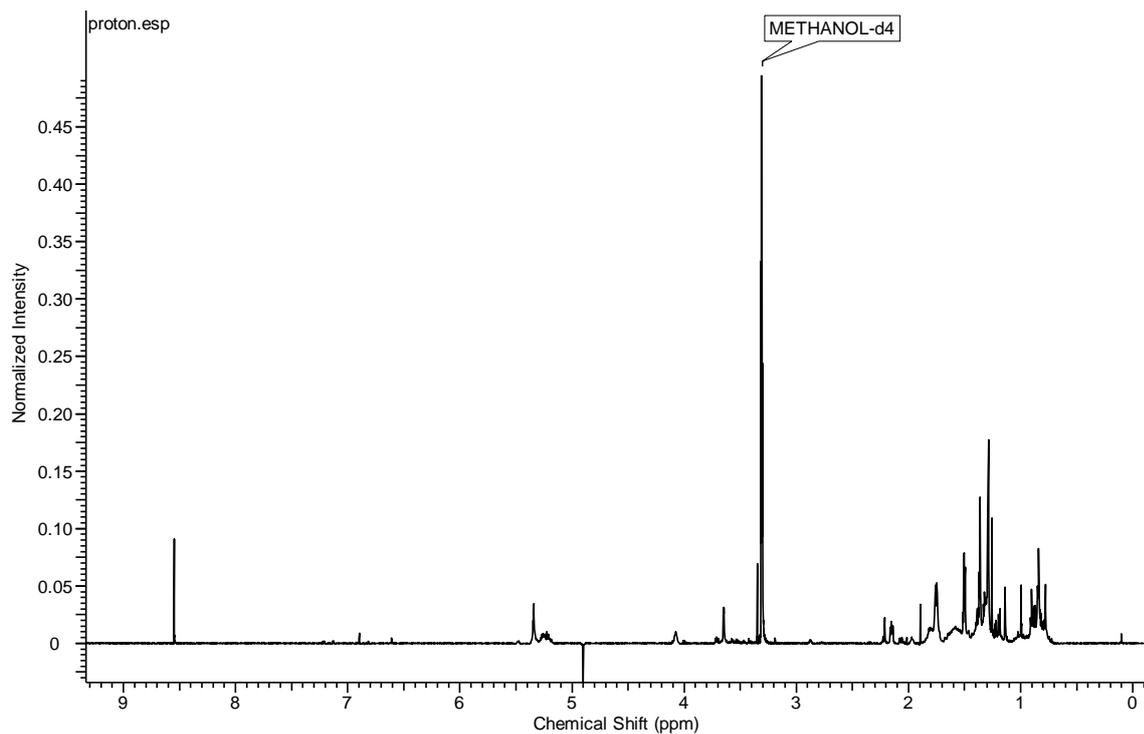


Figure 33. ^1H spectrum of compound **5** recorded in MeOD at 600MHz

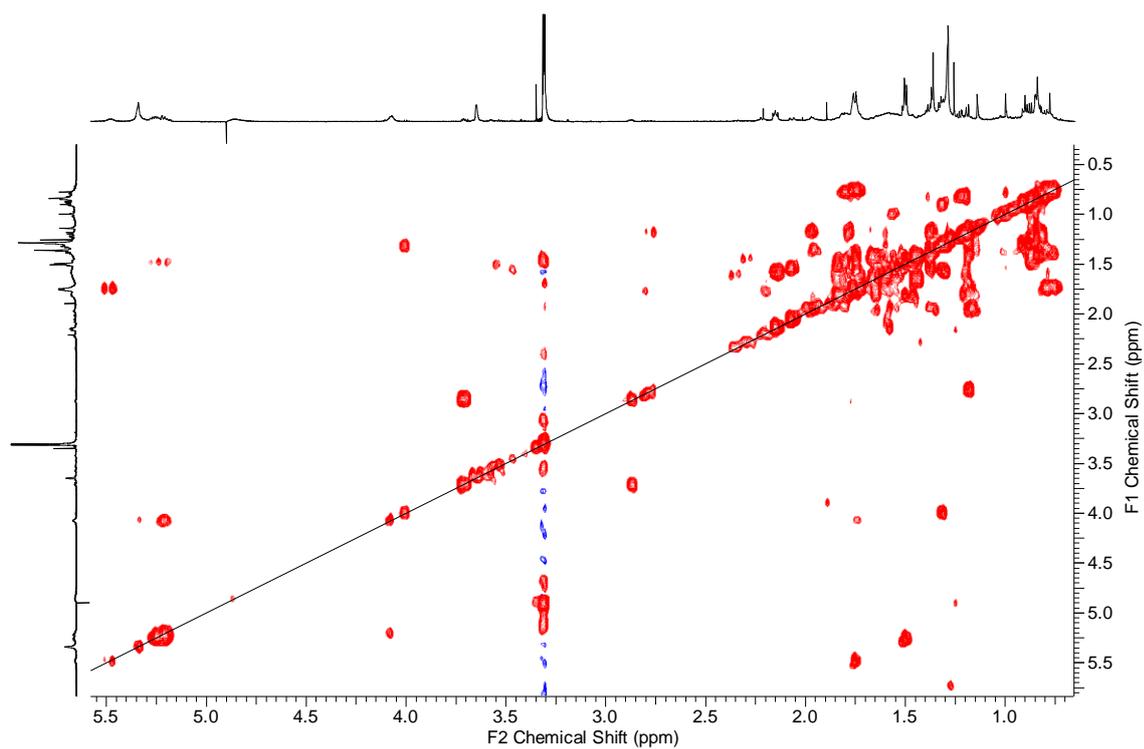


Figure 34. COSY spectrum of compound **5** recorded in MeOD at 600MHz

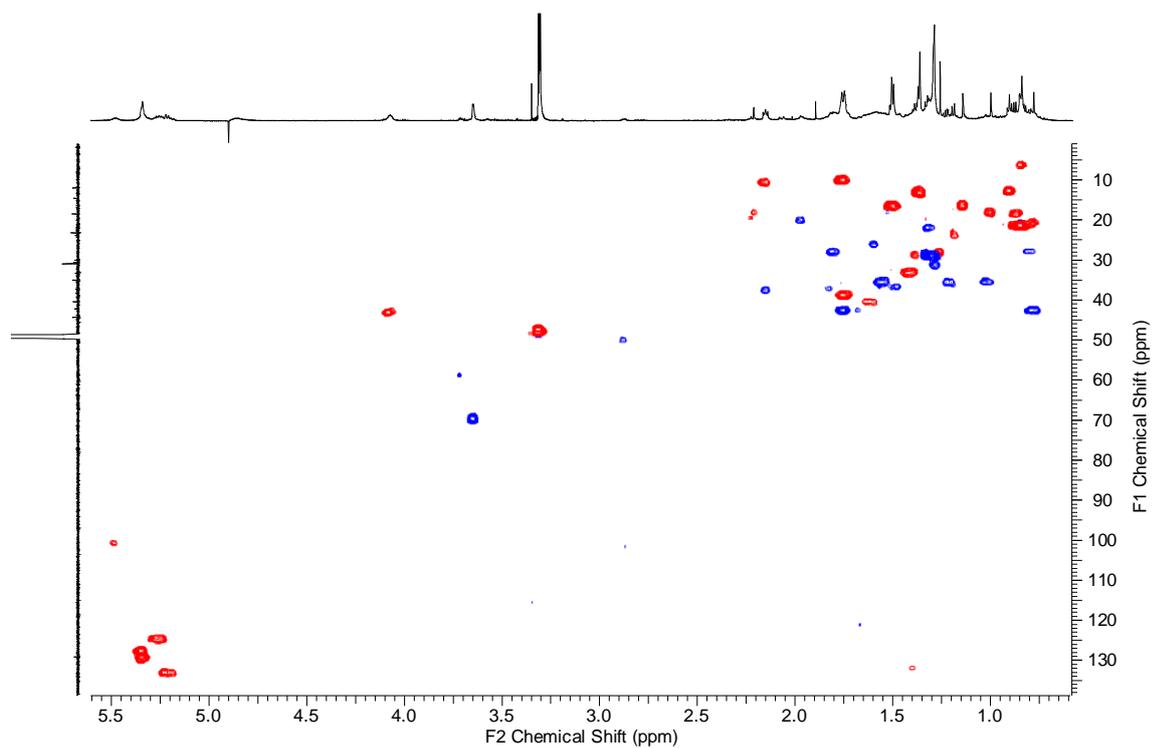


Figure S35. HSQC spectrum of compound **5** recorded in MeOD at 600MHz

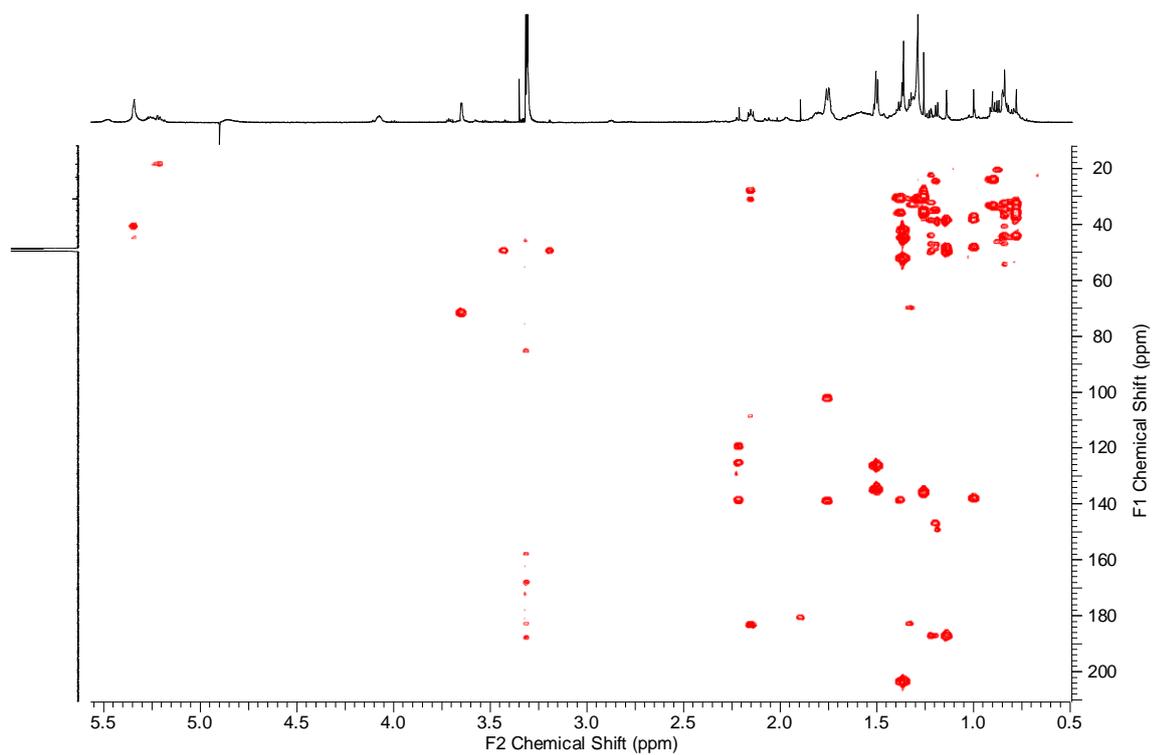


Figure 36. HMBC spectrum of compound **5** recorded in MeOD at 600MHz

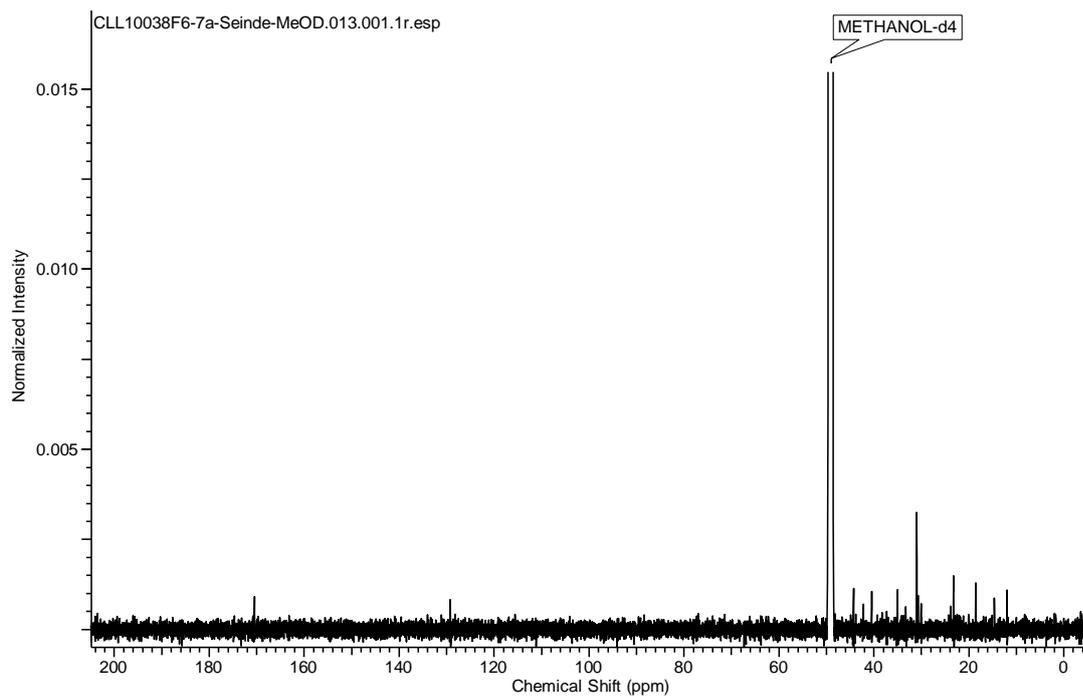


Figure 38. ^{13}C spectrum of compound **5** recorded in MeOD at 200MHz

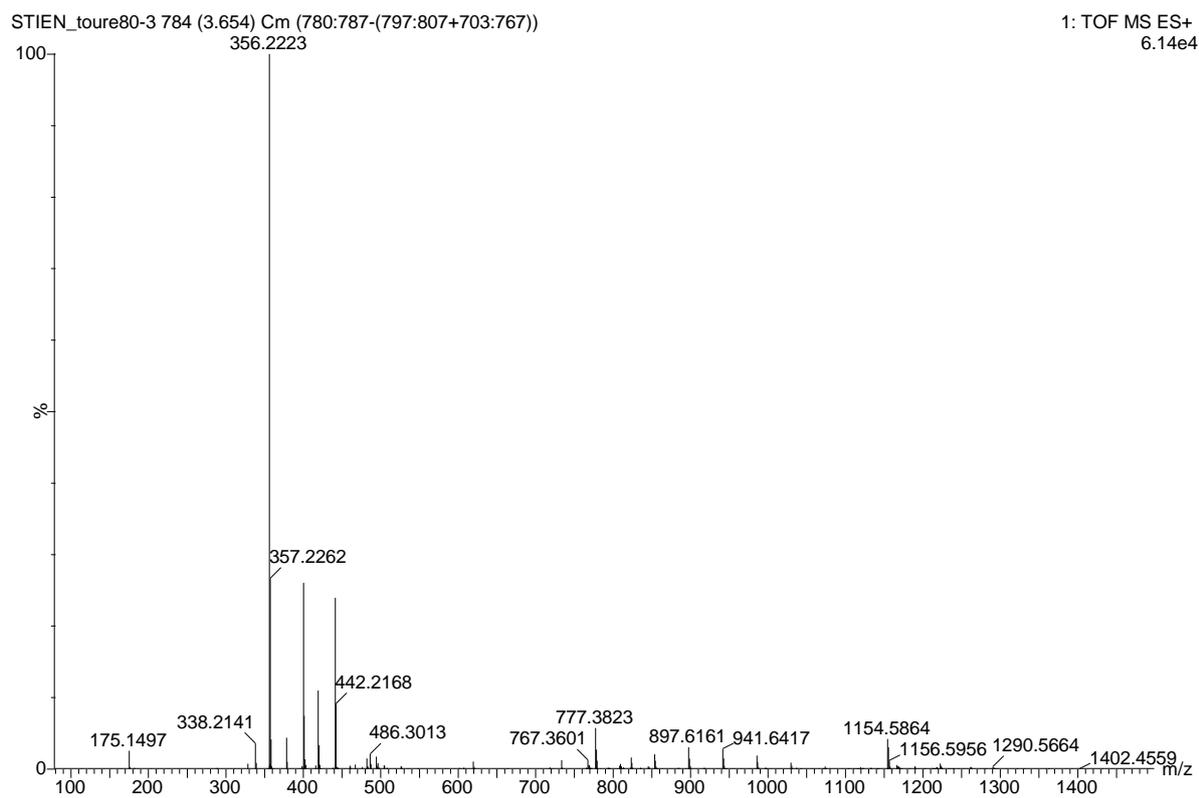


Figure S39. Mass spectrum of **5**

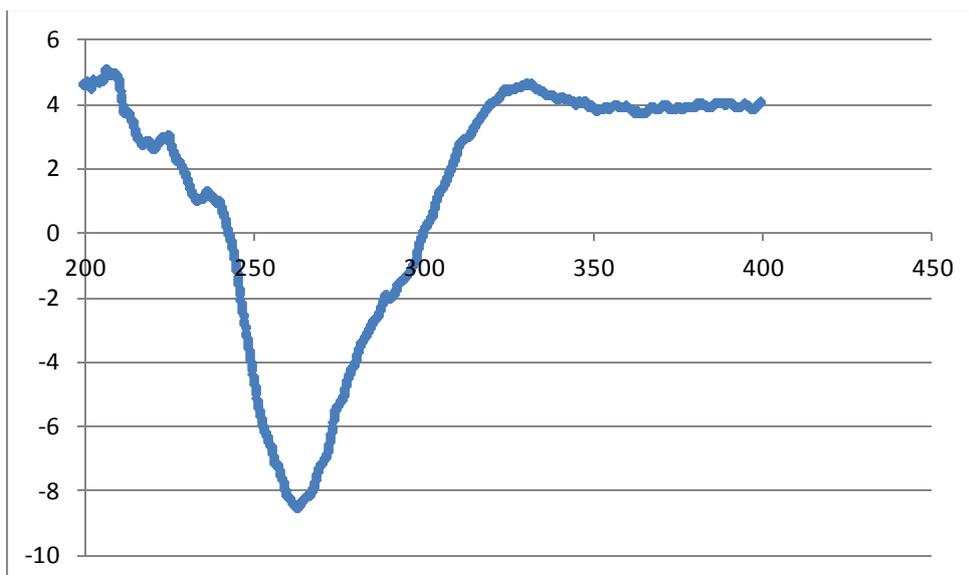


Figure S40. CD spectrum of **5**

Farinosone B (**6**): white powder; $[\alpha]^{20}_D$ -44° (c 0.07, MeOH); ^1H NMR (MeOH- d_4 , 500 MHz) δ 8.55 (1H, s, H-6), 8.02 (1H, br s, H-8), 7.62 (1H, br s, H-9), 7.31 (2H, br d, $J = 7.7$ Hz, H-2'), 6.90 (1H, br s, H-11), 6.81 (2H, br d, $J = 7.8$ Hz, H-3'), 6.61 (1H, br s, H-10), 6.53 (1H, br d, $J = 15.0$ Hz, H-13), 6.34 (1H, br s, H-12), 5.46 (1H, br d, $J = 9.8$ Hz, H-15), 2.48 (1H, m, H-16), 1.82 (3H, br s, H₃-20), 1.29 (1H, br s, H-17_b), 1.26 (1H, br s, H-17_a), 0.99 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H₃-19), 0.87 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H₃-18); HRESITOFMS m/z 422.1969 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{NO}_5$, 422.1967).

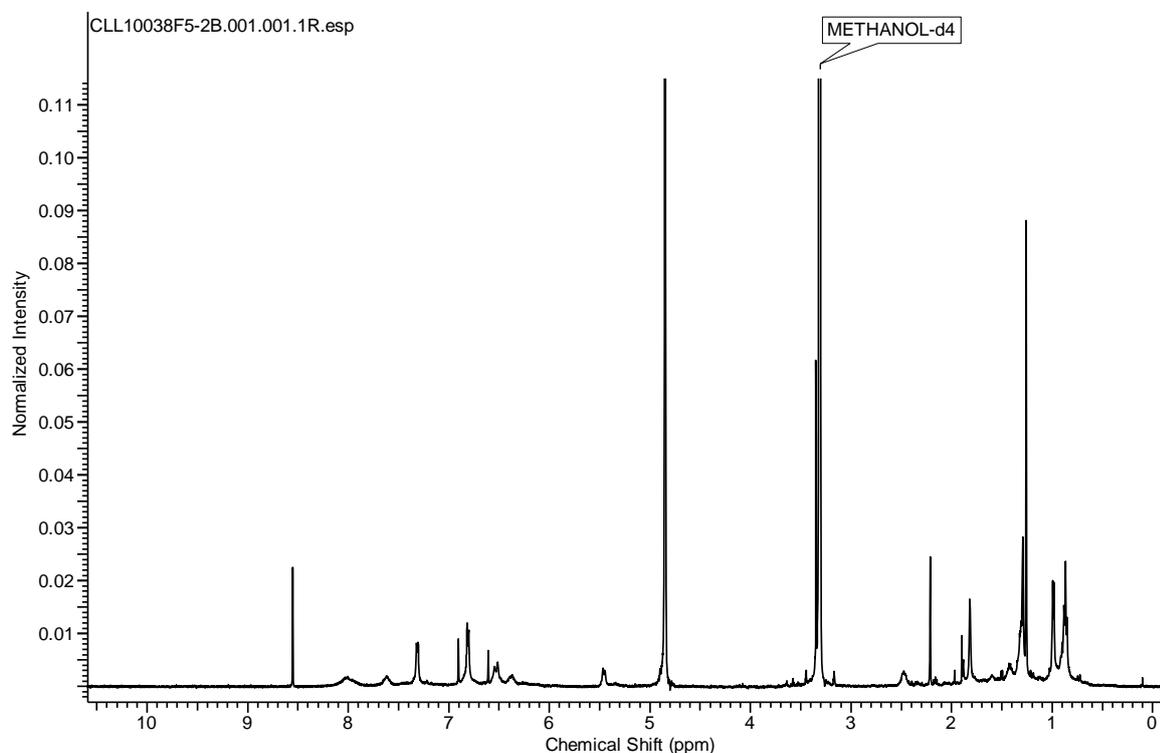


Figure 41. ^1H spectrum of compound **6** recorded in MeOD at 600MHz

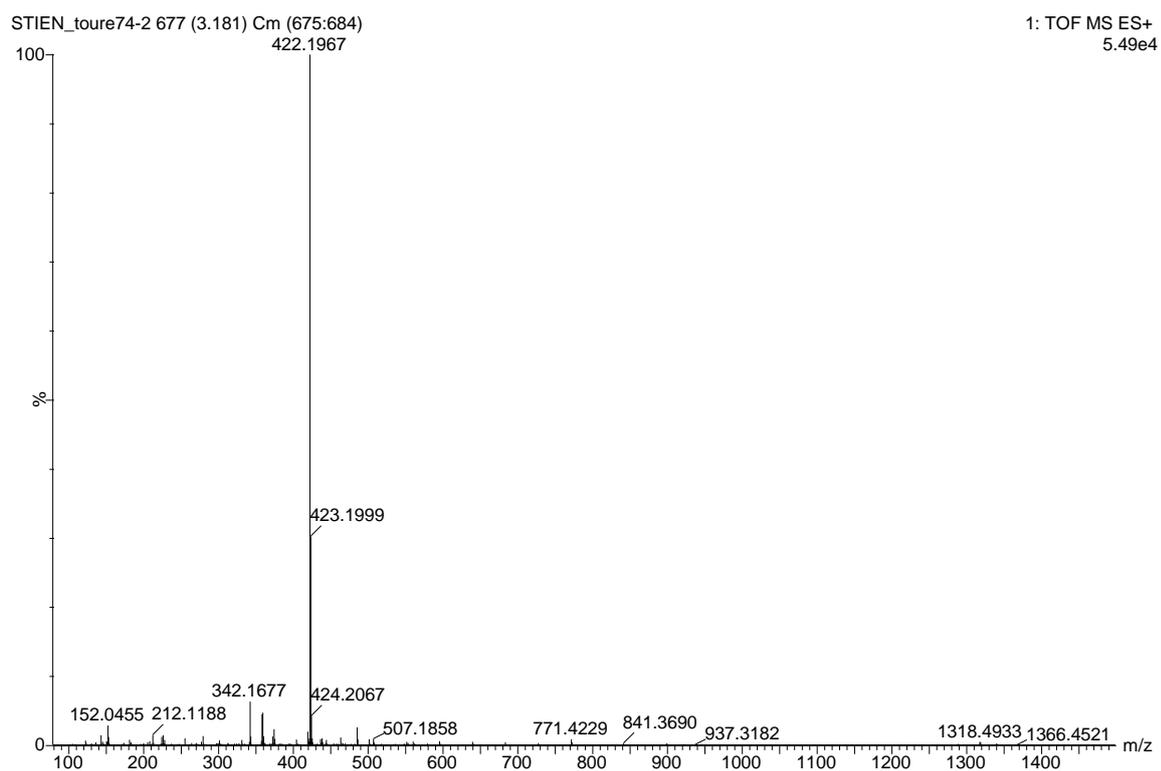


Figure S42. Mass spectrum of **6**.

Résultats complémentaires :

Lors de la mise en place des méthodes OSMAC nous avons également réalisé différentes co-cultures (**Figure 45**). Cette technique exploite le fait qu'en milieu naturel les micro-organismes sont en constante interaction avec d'autres micro-organismes de l'environnement. Ces échanges induisent l'activation de mécanismes de régulation complexes se traduisant par la biosynthèse de métabolites divers.²²⁸ Les co-cultures ont donc été effectuées avec des souches de micro-organismes isolées et/ou étudiées au cours du projet : *Penicillium* spp. SNB-ST21C, *Pantoea* spp. SNB-VECD14B et deux souches fongiques du genre *Mucor* SNB-VECD11D et SNB-VECD13A.

Ces tests de compétition ont été effectués en milieu solide, plus semblables aux conditions environnementales dans lesquelles évoluent ces champignons.

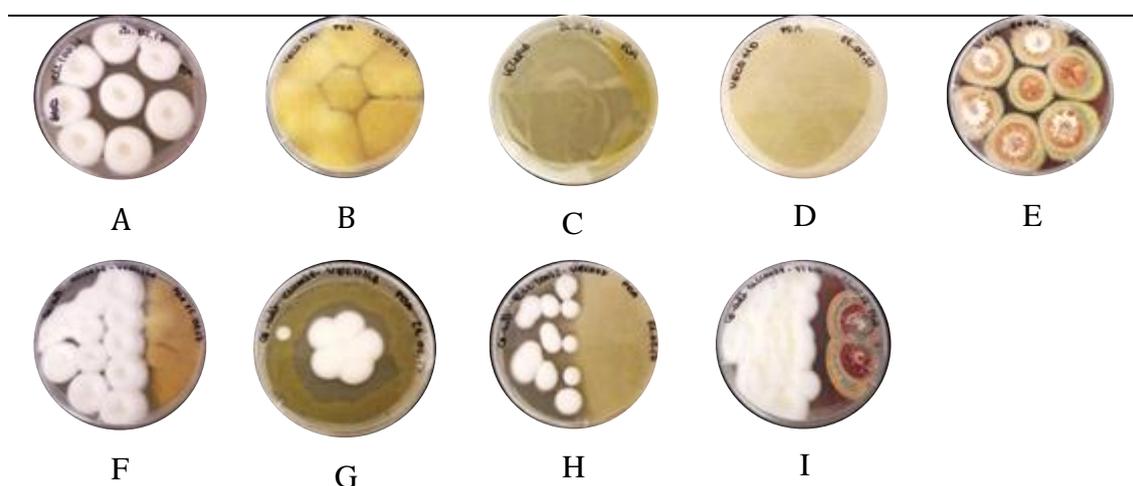


Figure 45: Photo des cultures OSMAC d'*Isaria farinosa*. A : *Isaria farinosa* SNB-CLL10038, B : *Mucor* spp. SNB-VECD13A, C : *Pantoea* spp. SNB-VECD14B, D : *Mucor* spp. SNB-VECD11D, E : *Penicillium* spp. SNB-ST21C, F : co-culture *I. farinosa*/*Mucor* spp., G : co-culture *I. farinosa*/*Pantoea* spp., H : *I. farinosa*/*Mucor* spp., I : co-culture *I. farinosa*/*Penicillium* spp.

Les extraits issus des différentes cultures (cultures pures et co-cultures) ont été analysés par UHPLC-MSMS afin de visualiser les modifications du métabolome. Les chromatogrammes obtenus sont disponibles en annexe.

Chaque extrait a ensuite été testé sur les micro-organismes pathogènes (**Tableau 6**).

²²⁸ Bertrand S, Schumpp O, et al. De novo production of metabolites by fungal co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. *J Nat Prod*. 2013; 76:1157–1165.

Tableau 6 : Résultats des activités biologiques sur micro-organismes pathogènes obtenues à partir des extraits de culture de souches seules et en co-culture

Cultures pures		CMI ($\mu\text{g/mL}$)			
		<i>S. aureus</i>	SARM	<i>T. rubrum</i>	<i>C. albicans</i>
SNB-CLL10038		>256	256	128	64
SNB-ST21C		>256	>256	256	256
SNB-VECD11D		>256	>256	>256	>256
SNB-VECD13A		>256	>256	>256	>256
SNB-VECD14B		>256	32	>256	>256
Co-cultures					
SNB-CLL10038	SNB-ST21C	>256	64	32	64
	SNB-VECD11D	>256	>256	>256	>256
	SNB-VECD13A	>256	128	64	128
	SNB-VECD14B	>256	>256	>256	>256

Les résultats des tests antimicrobiens ont révélé une augmentation de l'activité pour la co-culture *Isaria farinosa* SNB-CLL10038/*Penicillium* spp. SNB-ST21C sur SARM, *T. rubrum* et *C. albicans*. L'extrait issu de la culture pure de *Penicillium* ne présente aucune activité antimicrobienne contrairement à celui d'*Isaria farinosa*. L'observation des profils métabolomiques montre que l'activité observée pour la co-culture pourrait provenir de métabolites produits par *I. farinosa* (Figure 46). D'après les profils, seuls des ions minoritaires semblent être produits lors de la co-culture. On observe toutefois deux composés à m/z 390.2265 et 374.2314 sur-exprimés dans la co-culture. Ces deux composés ont été isolés et identifiés comme étant la paécilosétine et son analogue la paécilosétine C. Or la paécilosétine présente des activités antimicrobiennes (Article 3). Elle pourrait donc être responsable de l'activité observée pour la co-culture.

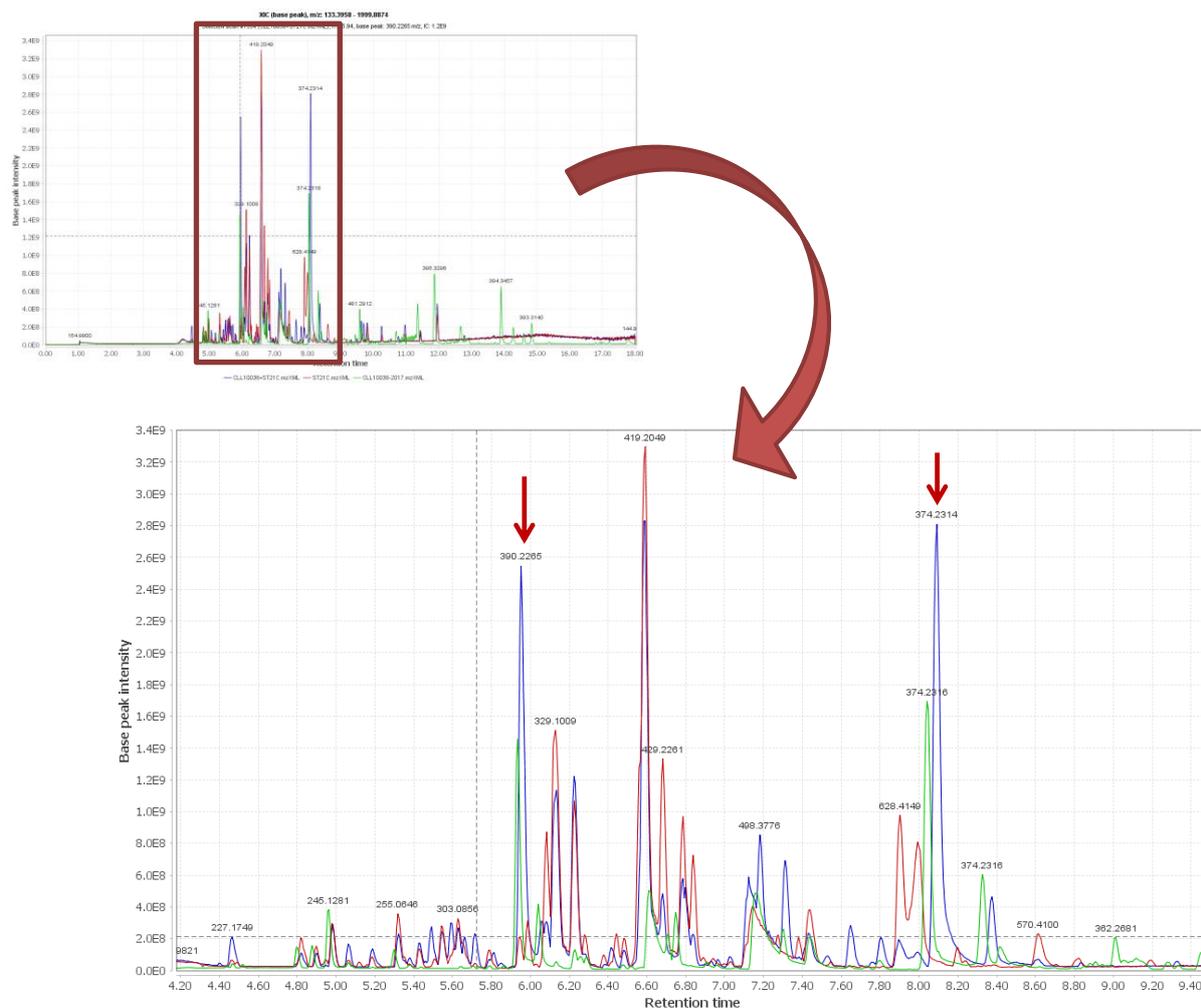


Figure 46 : Superposition des chromatogrammes issus des extraits des cultures OSMAC. En vert : SNB-CLL10038, en rouge : ST21C et en bleu : co-culture *I. farinosa* SNB-CLL10038 / *Penicillium* spp. SNB-ST21C. Les flèches indiquent deux composés antimicrobiens isolés d'*I. farinosa*.

De manière générale l'analyse des chromatogrammes laisse apparaître une surexpression de certains métabolites déjà présent dans les cultures pures et à l'inverse une inhibition de la synthèse d'autres composés. Une exploration plus poussée des extraits via les réseaux moléculaires pourrait permettre d'identifier d'éventuels composés induits par la compétition entre les différentes souches.

5 Etude chimique de l'extrait de *Pantoea* sp. SNB-VECD14B

Les bactéries du genre *Pantoea* sp.

Classification

Règne : Bacteria

Division : Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Pantoea*



Le genre *Pantoea* est un groupe d'espèces diversifié de bactéries à Gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Ces dernières présentent une pigmentation jaune.²²⁹ Aujourd'hui la caractérisation des espèces du genre *Pantoea* se base sur des caractéristiques génomiques et phénotypiques,²²⁹ mais, l'identification des espèces reste un défi du fait des recombinaisons et des transferts de gènes entre espèces.

La souche de ce genre la plus connue est *P. agglomerans* communément isolée chez l'Homme. D'autres espèces du genre *Pantoea* sont connues pour être phytopathogènes, provoquant des galles, pourritures et nécroses, sur une grande variété de plantes,²³⁰ ou pour former des associations mutualistes avec des plantes²³¹ et des insectes.^{229,232}

Ces bactéries, souvent associées aux pommiers et poiriers, produisent des composés antibiotiques protégeant les plantes d'un pathogène bactérien : *Erwinia amylovora*. Parmi les composés isolés de *Pantoea* sp. on retrouve l'herbicoline I,²³³ les pantocines A et B^{234,235} ou encore l'andrimide²³⁶ qui présentent des activités antibactériennes (**Figure 47**).

²²⁹ Walterson AM, Stavrínides J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Rev.* 2015; 39:968–984.

²³⁰ Volksch B, Thon S, et al. Polyphasic study of plant- and clinic-associated *Pantoea agglomerans* strains reveals indistinguishable virulence potential. *Infect Genet Evol.* 2009; 9:1381–1391.

²³¹ Malnoy M, Martens S, et al. Fire blight: applied genomic insights of the pathogen and host. *Annu Rev Phytopathol.* 2012; 50:475–494.

²³² Nadarasah G, Stavrínides J. Quantitative evaluation of the host-colonizing capabilities of the enteric bacterium *Pantoea* using plant and insect hosts. *Microbiol.* 2014; 160:602–615.

²³³ Ishimaru CA, Klos EJ, et al. Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. *Phytopathol.* 1988; 78:746–750.

²³⁴ Brady SF, Wright SA, et al. Pantocin B, an antibiotic from *Erwinia herbicola* discovered by heterologous expression of cloned genes. *J Am Chem Soc.* 1999; 121:11912–11913.

Les bactéries du genre *Pantoea* présentent une grande adaptabilité environnementale.²²⁹ En effet, des isolats de ce genre ont déjà été retrouvés dans des eaux et des sols contaminés. La capacité de certaines souches à résister et dégrader les polluants (herbicide, métaux lourds, hydrocarbures) en font de bons outils de bioremédiation.^{237,238,239,240}

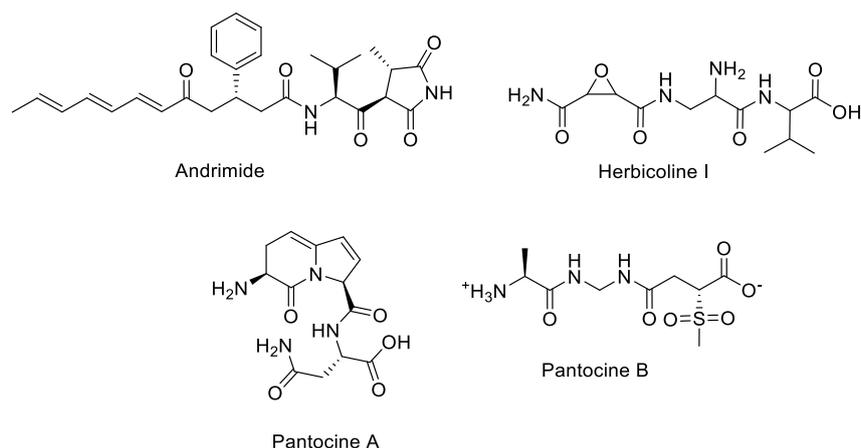


Figure 47 : Métabolites secondaires antibiotiques isolés de bactérie du genre *Pantoea*

²³⁵ Wright SA, Zumoff CH, et al. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67:284–292.

²³⁶ Fredenhagen A, Tamura SY, et al. Andrimid, a new peptide antibiotic produced by an intracellular bacterial symbiont isolated from a brown planthopper. *J Am Chem Soc.* 1987; 109:4409–4411.

²³⁷ Escalante G, Campos V, et al. Arsenic resistant bacteria isolated from arsenic contaminated river in the Atacama Desert (Chile). *Bull Environ Contam Toxicol.* 2009; 83:657–661.

²³⁸ Ozdemir G, Ceyhan N, et al. Biosorption of chromium(VI), cadmium(II) and copper(II) by *Pantoea* sp TEM18. *Chem Eng J.* 2004; 102:249–253.

²³⁹ Pileggi M, Pileggi S, et al. Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. *Chemosphere.* 2012; 86:1127–1132.

²⁴⁰ Vasileva-Tonkova E, Gesheva V. Biosurfactant production by antarctic facultative anaerobe *Pantoea* sp during growth on hydrocarbons. *Curr Microbiol.* 2007; 54:136–141

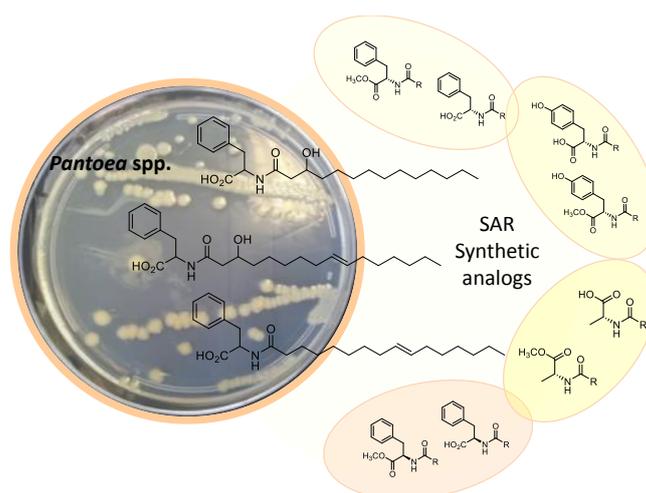
5.1 Article 4 : Characterization and structure-activity relationship study of lipoaminoacid and synthetic analogues from *Pantoea* sp. SNB-VECD14B

Cet article présente les résultats obtenus lors de l'étude par fractionnement bio-guidé de la souche SNB-VECD14B présentant une activité larvicide de 97,2% à 100 ppm et une CMI de 16 µg/mL sur *T. rubrum* lors du criblage initial.

Le fractionnement préliminaire de l'extrait a permis l'obtention de 8 fractions. L'étude des fractions 5 et 6, qui concentraient les activités antimicrobiennes et larvicides, a conduit à l'isolement et la caractérisation de trois nouvelles hydroxyacyl-phénylalanines. Au regard des activités observées pour ces composés, nous avons entrepris de synthétiser différents analogues structuraux afin d'étudier les relations de structure-activité pour cette classe de molécules. Ainsi 36 lipoaminoacides ont été synthétisés et testés sur larves d'*Aedes aegypti* et sur différents micro-organismes pathogènes.

Des composés de type dicétopipérazines ont également été isolés et identifiés des fractions actives. Ils sont présentés à la fin de cette partie.

Cet article est destiné au journal BioOrganic and Medicinal Chemistry.



Characterization and structure-activity relationship study of lipoaminoacid and synthetic analogues from *Pantoea* sp. SNB-VECD14B

Seindé Touré^{a*}, Sandy Desrat^a, Isabelle Dusfour^b, Didier Stien^c, Véronique Eparvier^{a*}

^aCNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), Université Paris-Sud, 91198 Gif-sur-Yvette, France

^bInstitut Pasteur de la Guyane (IPG), Unité de Contrôle et Adaptation des Vecteurs, 97306 Cayenne, Guyane française

^cSorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

Corresponding authors

* S. Touré. Tel.: +33 1 69 82 36 65; e-mail: seinde.toure@cnrs.fr

* V. Eparvier. Tel.: +33 1 69 82 36 79; e-mail: veronique.eparvier@cnrs.fr

Abstract

Three new hydroxyacyl-phenylalanine derivatives were isolated from a solid culture of the bacterium *Pantoea* spp. outlying from a *Diaspididae* insect cuticle. Their structures were elucidated by comprehensive analyses of NMR and MS spectroscopic data. The antimicrobial and insecticidal potency of these compounds were evaluated and showed 67 % of mortality on *Aedes aegypti* larvae at 100 ppm for **3** and CMI = 16 µg/mL for **1** on MRSA. In a second step, hydroxyacyl-phenylalanine analogues were synthesized in order to better understand the structure-activity relationships of this class of compound. Bioassays highlighted the antimicrobial potential of analogues containing saturated medium chain fatty acids (12 or 14 carbons) whereas unsaturated long-chain fatty acid (16 carbons) exhibiting larvicidal activity.

Keywords: bacteria, *Pantoea* spp., hydroxyacyl-phenylalanine, antimicrobial, larvicidal, *Aedes aegypti*

1. Introduction

The development of novel antimicrobial and insecticidal agents is urgent for global public health. Indeed drug-resistant pathogenic microorganisms such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) or vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE) emerge.¹ Others Gram-negative pathogens are particularly worrisome because they are becoming resistant to nearly all antibiotic drugs available including carbapenems.² These pathogens have become a major clinical problem, causing significant mortality in both healthy hosts and those with underlying comorbidities.³ It is essential to investigate new drugs to face the decreasing efficiency of current antibiotics.² The second major public health problem concerns mosquitoes and their ability to spread diseases like malaria, dengue, Chikungunya and more recently Zika virus. The World Health Organization (WHO) estimated that more than 80% of the world's population is at risk of vector-borne diseases, and each year more than 700.000 people die as a result.⁴ *Aedes* sp. mosquitoes are the primary vector for transmitting these diseases.⁵ Today the two main approaches to control them are genetic or chemical. Synthetic chemicals including organophosphates like temephos and fenitrothion or pyrethroids have been sprayed for decades in the environment. However, most of these synthetics have adverse effects, provoking the development of resistance, environmental pollution, toxic hazards to human and other non-target organisms.⁶ The misuse of these compounds result in loss of vector control efficacy. Specific safer pesticides are urgently needed.⁷

In this matter, natural products have proven to be an inestimable source of bioactive compounds.⁸ Among them, entomopathogenic microorganisms (natural enemies of insects) are known to produce bioactive metabolites implied in complex mechanisms of defence and self-protection. Indeed, to fulfil their ecological success, they produce several chemical entities, including insecticidal and/or antimicrobial metabolites.⁹

As part of our investigation into the secondary metabolites produced by entomopathogenic microorganisms, a collection of 57 strains were extracted and screened on *Aedes aegypti* mosquito larvae and on human pathogenic microorganisms (*Staphylococcus aureus*, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Candida albicans*, and *Trichophyton rubrum*). Extract from the bacterium *Pantoea* sp. SNB-VECD14B exhibited a mortality rate of 97.2 % on *Aedes ae.* larvae at 100 ppm and a minimum inhibitory concentration (MIC) of 16 µg/mL on *T. rubrum*. It was thus selected for further investigation.

2. Results

2.1. Isolation and structure elucidation

The AcOEt extract of *Pantoea* sp. SNB-VECD14B was subjected to bio-guided preparative HPLC on C₁₈ silica column to yield 3 pure compounds (Figure 1).

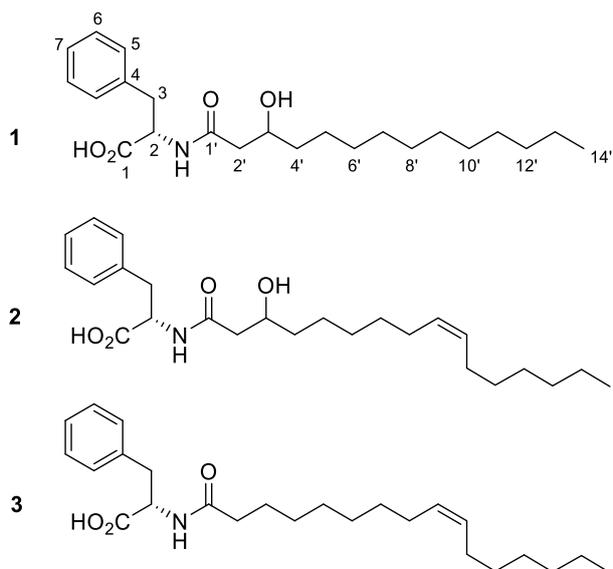


Figure 1. Compounds 1–3 isolated from *Pantoea* sp.

Molecular formula of Compound **1** was $C_{23}H_{37}NO_4$ determined by HRESI-TOFMS analysis, which showed a pseudomolecular ion at m/z 392.2701 $[M+H]^+$ (calculated for $C_{23}H_{38}NO_4^+$, 392.2795), corresponding to six degrees of unsaturation. The structure of this compound was deduced from NMR spectral data (Table 1). The 1H and ^{13}C NMR spectra of **1** suggested the presence of one terminal methyl (δ_H 0.90), a characteristic broad signal of fatty acid methylenes integrating for twenty protons (δ_C 30.9, δ_H 1.29) with two others distinct methylenes at δ_H 1.40 and 2.29/2.34, nine methines among which one was hydroxylated (δ_H 3.85) and five aromatic protons between 7.18 and 7.24 ppm. The sequence of 1H - 1H COSY signals from H2' to H5' and from H12' to H14' allowed to determine the presence of a hydroxylated fatty acid moiety. Correlations 1H - ^{13}C observed in HMBC spectrum between H2'/C1', C3' and C4' confirmed that compound **1** has a tetradecanoate moiety hydroxylated in C3' (Figure 2).

Another 1H - 1H correlations was observed between H2 and H3 and 1H - ^{13}C correlations between H2/C1, C3 and H3/C1, C2, C4 and C5 along with C1 chemical shift at δ 176.0 demonstrated the presence of phenylalanine unit. Although there was no correlation (COSY, HMBC, NOESY) between the phenylalanine and the fatty acid moieties, the only possible linkage is with an amide bond. This is consistent with the chemical shifts at C1 (δ_C 173.8), C2 (δ_C 55.9), and H2 (δ_H 4.60). This compound was identified as the *N*-(3-hydroxytetradecanoyl)phenylalanine.

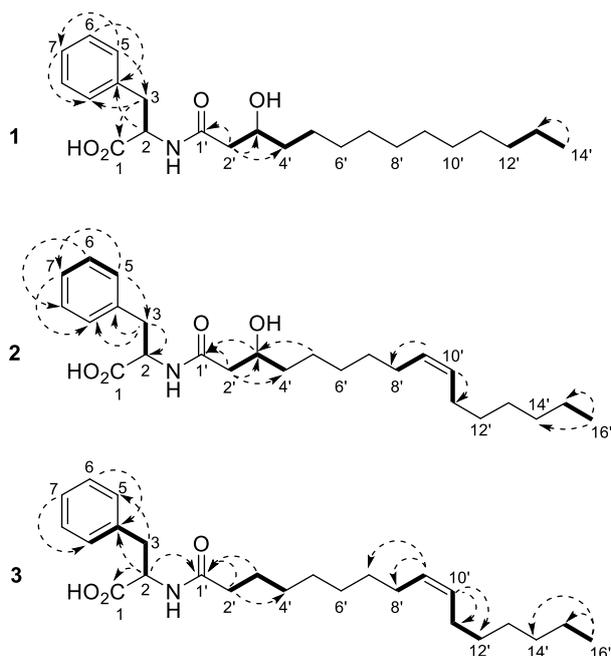


Figure 2. Key ^1H - ^1H COSY (bold line) and HMBC (dashed arrows) correlations

The molecular formula of compound **2** was determined as $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{NO}_4$ based on HRESI-TOFMS experiment at m/z 418.2837 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{NO}_4^+$, 418,2952), corresponding to seven degrees of unsaturation. The ^1H and ^{13}C NMR spectra revealed similarities to **1**. Only minor differences were observed with the presence of broad methylene signal integrating for fourteen protons, along with two deshielded protons at δ_{H} 5.35 and two methylene at δ_{H} 2.04 corresponding to a double bond methines and the two adjacent methylenes. COSY and HMBC data of **2** allowed to determine the fatty acid moiety as a 3-hydroxyhexadec-9-enoate hydroxylated in C3. The (*Z*) configuration of double bond was determined by comparison with the literature data based on the distinctive figure of olefinic protons.¹⁰ This compound was finally identified as the (*Z*)-*N*-(3-hydroxyhexadec-9-enoyl)phenylalanine.

Compound **3** HRESI-TOFMS experiment indicated molecular formula of $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{NO}_3$ at m/z 402.2946 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{NO}_3^+$, 402.3003), corresponding to seven degrees of unsaturation. Examining the ^1H and ^{13}C NMR spectra, compound **3** was obviously similar to molecule **2**. The only difference concern the hydroxyl group, the neighbouring protons and carbons signals which are absent for molecule **3** (Table 1). Eventually, the fatty acid moiety was determined as a hexadec-9-enoate. The COSY and HMBC spectra showed the same correlations than **2**, along with a correlation H2/C1' further confirming the amide linkage between the two moieties. The compound was therefore the (*Z*)-*N*-Hexadec-9-enoylphenylalanine (Figure 2).

Table 1. NMR Spectroscopic Data (CD₃OD) for compounds **1**, **2** and **3**

Position	Compound 1		Compound 2		Compound 3	
	δ_{C}^a , type	δ_{H}^b , m (J in Hz)	δ_{C}^c , type	δ_{H}^d , m (J in Hz)	δ_{C}^a , type	δ_{H}^b , m (J in Hz)
1	176.0, C		176.3, C		176.5, C	
2	55.9, CH	4.60, m	57.6, CH	4.53, m	56.0, CH	4.62, dd (8.0, 4.7)
3	38.7, CH ₂	2.98, dd (13.9, 8.2) 3.21, dd (13.9, 4.5)	39.4, CH ₂	2.97, dd (14.0, 7.7) 3.21, dd (14.0, 4.5)	39.0, CH ₂	2.94, dd (13.7, 8.7) 3.22, dd (13.9, 4.7)
4	139.0, C		139.8, C		139.2, C	
5	130.5, CH	7.24, m	130.7, CH	7.24, m	130.5, CH	7.23, m
6	129.3, CH	7.25, m	129.3, CH	7.22, m	129.4, CH	7.24, m
7	127.6, CH	7.18, m	127.3, CH	7.15, m	127.6, CH	7.17, m
1'	173.8, C		173.5, C		175.8, C	
2'	44.6, CH ₂	2.29, dd (14.4, 5.2) 2.34, dd (14.4, 7.4)	44.9, CH ₂	2.25, dd (14.4, 7.8) 2.30, dd (14.5, 4.9)	37.2, CH ₂	2.13, t (7.4) 2.23, t (7.5)
3'	69.6, CH	3.85, m	67.9, CH	3.85, m	27.1, CH ₂	1.48, m
4'	38.0, CH ₂	1.40, m	38.2, CH ₂	1.39, m	30.3, CH ₂	1.29, br s
5'	30.9, CH ₂	1.29, br s	31.0, CH ₂	1.30, m	23.8, CH ₂	1.31, br s
6'	30.9, CH ₂	1.29, br s	31.0, CH ₂	1.30, m	30.3, CH ₂	1.29, br s
7'	30.9, CH ₂	1.29, br s	31.0, CH ₂	1.30, m	30.3, CH ₂	1.29, br s
8'	30.9, CH ₂	1.29, br s	28.3, CH ₂	2.04, m	30.3, CH ₂	2.03, m
9'	30.9, CH ₂	1.29, br s	130.9, CH	5.40, m	131.0, CH	5.35, m
10'	30.9, CH ₂	1.29, br s	130.9, CH	5.40, m	131.0, CH	5.35, m
11'	30.9, CH ₂	1.29, br s	28.3, CH ₂	2.04, m	30.3, CH ₂	2.03, m
12'	30.9, CH ₂	1.29, br s	31.0, CH ₂	1.30, m	30.5, CH ₂	1.33, br s
13'	23.6, CH ₂	1.31, m	31.0, CH ₂	1.30, m	30.5, CH ₂	1.33, br s
14'	14.4, CH ₃	0.90, t (6.8)	31.0, CH ₂	1.30, m	30.5, CH ₂	1.33, br s
15'			23.9, CH ₂	1.30, m	23.8, CH ₂	1.31, br s
16'			14.6, CH ₃	0.90, t (6.8)	14.6, CH ₃	0.90, t (6.8)

a Data recorded at 125 MHz.

b Data recorded at 500 MHz.

c Data recorded at 600 MHz.

d Data recorded at 200 MHz.

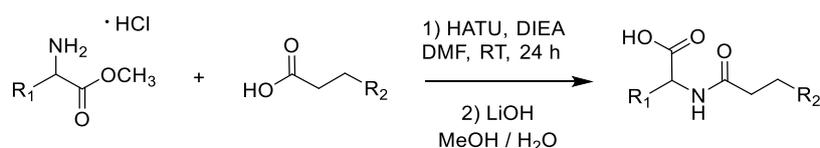
Compounds **1–3** isolated from *Pantoea* spp. were assayed for their antimicrobial and insecticidal activities against human pathogenic microorganisms and *Ae. aegypti* larvae (Table 2). The bioassays showed that compound **1** exhibited slight larvicidal and antibacterial activities. In contrast we observed larvicidal activity with mortality rate of 67.3 % and MIC 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on methicillin-resistant *S. aureus* for compound **3**. Based on difference of activity observed in bioassays, we undertook to synthesize analogues of compounds **1–3** in order to study structure-activity relationship of this class of compounds (Figure 3).

2.2. Synthesis

Our SAR investigation began with the synthesis of various hydroxyacyl-phenylalanine analogues based on modifications of the core structure of compound **3**. We set out to change the carbon chain length, the nature of amino acid, their L or D configuration, and the number of unsaturations on the alkyl chain (Figure 3).

A peptidic coupling between L- or D amino acid methyl esters and fatty acids in presence of HATU and Hunig's base, followed by saponification of the ester function into the corresponding carboxylic acid with lithium gave a series of 32 hydroxyacyl-phenylalanine analogues. From L- and D-phenylalanine methyl ester, 16 esters

derivatives (compound **4** to **19**) were prepared with varying the chain lengths (from 12 to 20 carbon atoms) and different level of insaturation. The ester compounds were then hydrolyzed to obtain the corresponding carboxylic acids (compound **22** to **37**). Compounds **5**, **9**, **13**, **17**, **23**, **27**, **31** and **35** were *Z* alkene derivatives whereas compounds **10**, **18**, **28** and **36** presented *E* alkene configuration. Two other series of lipoaminoacids (**20**, **21**, **38**, and **39**) were prepared following the same synthetic procedures from palmitoleic acid and L-alanine and L-tyrosine methyl esters. The general synthetic process is shown in Scheme 1. All synthesized compounds **4–39** were confirmed by NMR and HRESI-TOFMS analyses.



Scheme 1. Synthesis process of lipoaminoacid

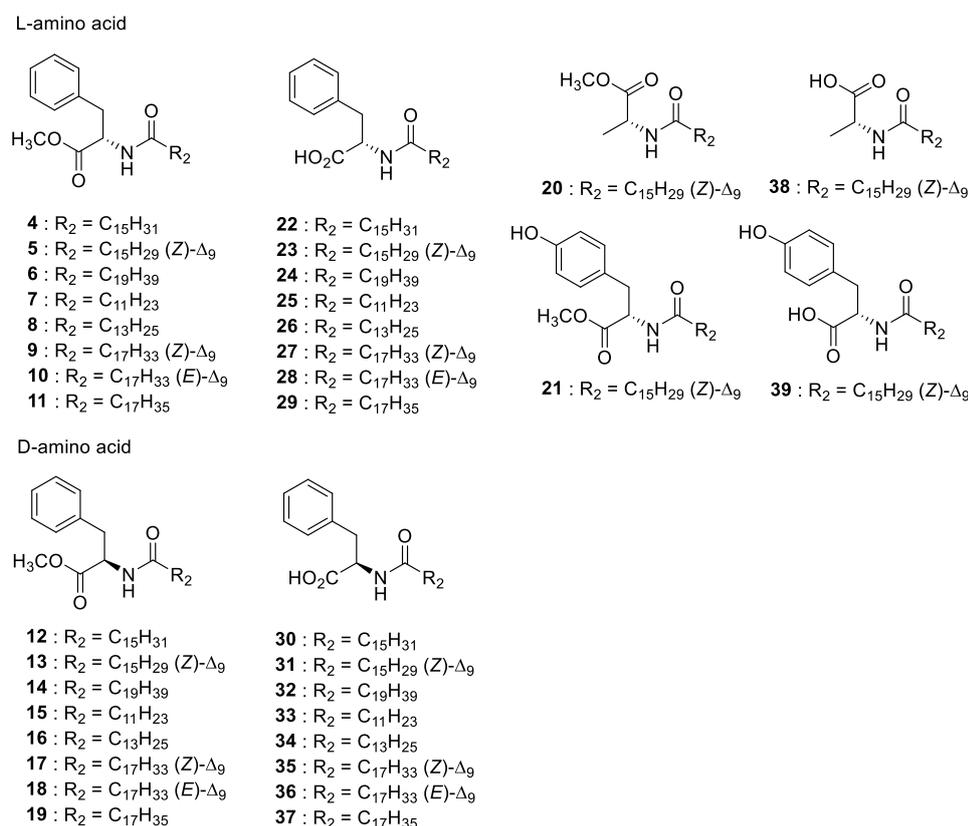


Figure 3. Compounds **4–39** synthesized

2.3. Biological assays

Natural and synthetic compounds were evaluated for their larvicidal and antimicrobial activities (Table 2).

First, results showed that best antimicrobial activities were obtained with **8**, **25**, **26**, **33** and **34** with the highest antimicrobial activity observed for compound **34** (MIC < 8 on MRSA and *T. rubrum*) and **8** (MIC 8 µg/mL on MRSA). Other active compounds exhibited MIC around 32 µg/mL against at least one pathogenic strain. A major part of these compounds presented a carboxyl group and saturated alkyl chain with 12 or 14 carbons. No difference was gained by modifying amino acid configuration.

Secondly, compounds **13**, **21**, **23**, **26**, **27**, **30**, **31**, **35** and **36** appeared to be larvicidal with mortality rate from 20.4% to 71.1 % at 10 ppm. All these compounds possessed long carbon chain (mostly C16 and C18). Moreover compounds containing the D isomer of phenylalanine (**30**, **31**, **35** and **36**) were more active than analogues containing the L isomer (**22**, **23**, **27** and **28**).

We next evaluated the effect of unsaturation on alkyl chain. Unsaturated molecules were more active than saturated ones (mortality rate of 23.3% for **30** whereas 71.1 % for **31** and mortality rate of 2.3% for **37** whereas 53.3% for **35**). The *Z*-configuration displayed better larvicidal effect than the *E* (compounds **27** and **35** contrary to **28** and **36**).

Afterwards, only compound **23** showed larvicidal and slight antibacterial activity with 43% of mortality on *Ae. aegypti* larvae and MIC 64 µg/mL on MRSA. The methyl ester form (**5**) showed 8.2% of mortality on larvae and CMI > 256 µg/mL on all pathogenic strains.

We also investigated effect of amino acid replacement on compounds bioactivity. In a general way the methyl ester form of tyrosine and alanine lipoaminocids (compounds **20** and **21**) exhibited no antimicrobial activity. In contrast the both acid forms (**38** and **39**) appeared to be more active than phenylalanine analogue (**23**). Concerning the larvicidal activity, only the methyl ester tyrosine (**21**) showed mortality rate about 30%.

Table 2. Antimicrobial and insecticidal activities of compounds **1–3** and synthetic analogues **4–39**

Compound	Larvicidal activity (% mortality at 10 ppm)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
		<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>T. rubrum</i>
1	32.1		>256	64	
2			>256	128	
3	67.3		>256	16	128
4	0	>256	>256	>256	
5	8.2	>256	>256	>256	>256
6	0	>64	>256	>64	
7	2.2	>256	>256	>256	>256
8	10.6	>256	>256	8	>256
9	0	>256	>256	>256	>256
10	10.2	>256	>256	>256	>256
11	6.2	>256	>256	>256	>256
12	6	>256	>256	>256	>256
13	20.4	>256	>256	>256	>256
14	2.1	>64	>64	>64	>256
15	4	>256	>256	>256	>256
16	1.9	>256	>256	>256	>256
17	0	>256	>256	>256	>256
18	1.8	>256	>256	>256	>256
19	5.5	>256	>256	>256	>256
20	3.8	256	>256		256
21	29.4	>256	>256	>256	64
22	2.3	>256	>256	>256	>256
23	42.9	>256	>256	64	>256
24	4.5	>256	>256	>256	>256
25	2.1	>256	64	32	32
26	26.5	>256	>256	>256	32
27	31.2	>256	>256	>256	>256
28	19.1	>256	>256	>256	>256
29	4.0	>256	>256	>256	>256
30	23.3	>256	>256	>256	
31	71.1		>256	>256	>256
32	4.5	>256	>256	>256	>256
33	6.1	64	64	64	32
34	18.7	>256	>256	<8	<8
35	53.3	>256	>256	>256	>256
36	49.0		>256	>256	>256
37	2.3	>256	>256	>256	>256
38	4.5		32	32	32
39	4.5	>256	>256	32	32
Pos. Ctrl.^a		4	0.2	0.6	4

^a Postitive control: oxacillin for *S. aureus* ; fluconazole for *C. albicans* and *T. rubrum* ; vancomycin for MRSA.

3. Conclusion

Our study concerning secondary metabolites of insect-associated microorganisms showed that these strains could produce larvicidal and antimicrobial compounds. Indeed, we highlighted that *Pantoea* sp. SNB-VECD14B can biosynthesized

lipoaminoacids with either antimicrobial and/or insecticide activity. Three hydroxyacyl-phenylalanine derivatives were isolated and characterized from AcOEt extract and different analogs were synthesized to demonstrate some structure activity relationships. First, we have observed that the larvicidal and/or antimicrobial activities were related to the presence of a carboxylic acid group on the compounds. In addition, we observed that compounds with a long carbon chain with *Z* unsaturation exhibited the highest larvicidal activity. In contrast, compounds exhibiting antimicrobial activity had a saturated C12 or C14 chain. The absolute configuration of the amino acid does not seem to have an effect on the antimicrobial activity, whereas this configuration improves larvicidal activity.

The lipoaminoacid containing tyrosine and alanine units appeared to be less larvicidal than analogues with phenylalanine. Conversely better antimicrobial results were recorded.

The lipoaminoacids studied appear to have similar biological and structural properties of free fatty acids.^{11,12} Indeed, their amphipathic structures provide a wide range of activities but further studies are needed to understand their mode of action. In view of the biological activities observed, these molecules could be an alternative to common antimicrobial agents for application in agriculture, food preservation, or cosmetic.

4. Experimental section

4.1. General procedures

Optical rotations were obtained on an Anton Paar MCP 200 polarimeter in a 100 mm-long 350 μ L cell using MeOH as a solvent at 20°C. High resolution ESITOFMS measurements were performed using a Waters Acquity UHPLC system coupled to Waters Micromass LCT-Premier Time-of-Flight mass spectrometer equipped with an electrospray interface (ESI). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) data were recorded in CD₃OD on a Bruker 500 MHz and 600 MHz spectrometers equipped with a 1 mm inverse detection probe. Chemical shift (δ) are reported in ppm based on TMS signal and coupling constant (*J*) are reported in Hertz. Flash chromatography was performed on a Grace Reveleris system with UV and ELSD detectors equipped with a 120 g C18 column or an 80 g silica column. HPLCs were conducted on a Gilson system equipped with a 322 pumping device, a GX-271 fraction collector, a 171 diode array detector and a prepELSII detector electrospray nebulizer. Columns used in analytical analysis included a Phenomenex Luna C18 (5 μ m, 4.6 x 250 mm) and a Phenomenex Kinetex C8 (5 μ m, 4.6 x 250 mm). Columns used in preparative analysis included a Phenomenex Luna C18 (5 μ m, 21.2 x 250 mm) and Kinetex C8 (5 μ m, 21.2 x 250 mm) columns.

4.2. Biological material

An individual of the insect species (Diaspididae) infected by entomopathogenic microorganisms was collected in Montsinéry, French Guiana. The cuticle of the insect

was scraped with a handle and transplanted on a Petri dish containing a solid Potato Dextrose Agar (PDA) medium and then stored at 28 °C. After one day, growing fungi hyphae were removed and transferred into another Petri dish. The strain SNB-VECD14B was saved in triplicate at -80 °C in H₂O – Glycerol (50:50). A sample was submitted for amplification of nuclear ribosomal internal transcribed spacer region ITS1 which allowed identification by comparison with NCBI sequence. The sequence was registered in the NCBI Genbank database with the accession number KX858894 and identified as *Pantoea* spp. Molecular analysis was performed externally by BACTUP, France.

4.3. Culture, extraction and isolation

The fungal strain was cultivated on Petri dishes of Mueller Hinton (MH) solid medium initially on a small scale then on 176 14-cm Petri Dishes at 28 °C during 8 days. The culture medium containing the mycelium was cut into small pieces and macerated with ethyl acetate (EtOAc) at room temperature on a rotary shaker (70 rpm) during 48 h. The content was extracted three times with EtOAc (3 x 5 L) in a separating funnel. The combined organic layers were washed with water. The organic solvent was evaporated to dryness under reduced pressure to yield the crude extract (2.5 g). A part of the crude extract (2.35 g) was fractionated by reverse flash chromatography on C18 column with linear gradient water – acetonitrile (v/v, 1:0 to 0:1 in 20 min, flow rate 80 mL/min) followed by another gradient of acetonitrile - methylene chloride (v/v, 1:1 to 0:1 in 10 min, flow rate 80 mL/min) to generate 8 fractions, from A to H. The larvicidal and antimicrobial activities were concentrated in fractions E (60.5 mg), F (445.7 mg), G (898.7 mg) and H (108.4 mg).

Fraction E was fractionated by preparative HPLC with H₂O–ACN (37:63 to 26:74 in 30 min, flow rate 21 mL/min) to afford compound **1** (1.9 mg, *t_R* 20.40 min) and compound **2** (1.2 mg, *t_R* 24.10 min).

Fraction F was fractionated by preparative HPLC with H₂O–ACN (33:67 to 17:83 in 30 min, flow rate 21 mL/min) to afford compound **3** (10.3 mg, *t_R* 17.10 min).

Compound (1): $[\alpha]_D^{20} = + 29.0$ (*c* 0.2, MeOH); ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table S1; HRESITOFMS *m/z* 392.2701 [M+H]⁺ (calcd for C₂₃H₃₈NO₄⁺, 392.2795).

Compound (2): $[\alpha]_D^{20} = + 6.0$ (*c* 0.2, MeOH); ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table S2; HRESITOFMS *m/z* 418.2837 [M+H]⁺ (calcd for C₂₅H₄₀NO₄⁺, 418.2952).

Compound (3): $[\alpha]_D^{20} = + 12.5$ (*c* 0.2, MeOH); ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table S3; HRESITOFMS *m/z* 402.2946 [M+H]⁺ (calcd for C₂₅H₄₀NO₃⁺, 402.3003).

4.4. Synthesis of analogues **4–39**.

General synthetic procedure for lipoaminoacid methyl ester synthesis. To a mixture of the fatty acid (100 mg), the amino acid methyl ester (1 equiv.) and HATU (1.5 equiv.) was added DMF (5 mL) followed by DIEA (3 equiv.) under N₂ atmosphere. The reaction mixture was stirred at RT overnight. A saturated solution of ammonium

chloride (NH₄Cl) was added and the reaction mixture was extracted with *tert*-butylmethylether (3 times). Combined organic phases were dried with Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude mixture was purified by flash chromatography on silica gel to provide compounds **4-21**.

(L)-methyl palmitoylphenylalaninate (**4**). The compound was isolated as a white powder (46%). $[\alpha]_D^{20} = +48.0^\circ$ (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.25 (m, 5H, H5 to H7), 4.70 (dd, $J = 9.6, 4.9$ Hz, 1H, H2), 3.70 (s, 3H, H8), 3.17 (dd, $J = 13.9, 5.6$ Hz, 1H, H3b), 2.95 (dd, $J = 15.8, 6.4$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H2'), 1.49 (qt, $J = 7.4$, 2H, H3'), 1.29 (br s, 22H, H4' to H15'), 0.90 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, H16'); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 176.3 (C, C1), 173.8 (C, C1'), 138.4 (C, C4), 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 56.2 (CH₂, C2), 52.8 (CH₃, C8), 38.5 (CH₂, C3), 36.8 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C3' to C14'), 30.9-30.2 (CH₂, C3' to C14'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C15'), 14.6 (CH₃, C16'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ m/z 418.3394 (calcd for C₂₆H₄₄NO₃⁺, 418.3316).

(L)-methyl (Z)-hexadec-9-enoylphenylalaninate (**5**). The compound was obtained as a white powder (28%). $[\alpha]_D^{20} = (c 0.1, \text{MeOH})$; ¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz) δ / ¹³C-NMR (CD₃OD, 125MHz) δ (C, C-); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ m/z 416.3168 (calcd for C₂₆H₄₂NO₃⁺, 416.3159).

(L)-methyl icosanoylphenylalaninate (**6**). The compound was obtained as a white powder (49%). ¹H-NMR (CD₃OD, 300MHz) δ 7.27 (m, 5H, H5 to H7), 4.7 (m, 1H, H2), 3.72 (s, 3H, H8), 3.19 (dd, $J = 13.8, 5.5$ Hz, 1H, H3b), 2.96 (dd, $J = 13.8, 9.2$ Hz, 1H, H3a), 2.17 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H2'), 1.52 (m, 2H, H3'), 1.32 (br s, 32H, H4' to H19'), 0.93 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H20') / ¹³C NMR (CD₃OD, 125MHz) δ 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 55.2 (CH₂, C2), 52.8 (CH₃, C8), 38.5 (CH₂, C3), 36.8 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C4' to C18'), 30.9-30.2 (CH₂, C4' to C18'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C19'), 14.6 (CH₃, C20') ; HRESI-TOFMS [M+H]⁺ m/z 474.4174 (calcd for C₃₀H₅₂NO₃⁺, 474.3942).

(L)-methyl dodecanoylphenylalaninate (**7**). The compound was obtained as a white powder (70%). $[\alpha]_D^{20} = +78.0^\circ$ (c 0.1, MeOH); ¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz) δ 7.20 (m, 1H, H7), 7.27 (m, 1H, H5 - H6), 4.68 (dd, $J = 9.5, 5.5$ Hz, 1H, H2), 3.69 (s, 3H, H8), 3.16 (dd, $J = 13.9, 5.5$ Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, $J = 13.9, 9.5$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H2'), 1.49 (qt, $J = 7.3$, 2H, H3'), 1.29 (br s, 16H, H4' to H11'), 0.90 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H12'); ¹³C NMR (CD₃OD, 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 173.8 (C, C1'), 138.4 (C, C4), 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 55.2 (CH₂, C2), 52.8 (CH₃, C8), 38.5 (CH₂, C3), 36.8 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C3' to C10'), 30.9-30.2 (CH₂, C3' to C10'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C11'), 14.6 (CH₃, C12'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ m/z 362.2698 (calcd for C₂₂H₃₆NO₃⁺, 362.2690).

(L)-methyl tetradecanoylphenylalaninate (**8**). The compound was obtained as a white powder (87%). $[\alpha]_D^{20} = +97.0^\circ$ (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 4.68 (dd, $J = 9.3, 5.4$ Hz, 1H, H2), 3.69 (s, 3H, H8), 3.16 (dd, $J = 13.9, 5.4$ Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, $J = 13.9, 9.5$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H2'), 1.49 (qt, $J = 7.4$, 2H, H3'), 1.29 (br s, 20H, H4' to H13'), 0.90 (t, $J = 6.5$ Hz, 3H, H14'); ¹³C NMR (CD₃OD,

125MHz) δ 176.3 (C, C1), 173.9 (C, C1'), 138.4 (C, C4), 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 55.2 (CH₂, C2), 52.8 (CH₃, C8), 38.5 (CH₂, C3), 36.9 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C4'to C12'), 30.9-30.2 (CH₂, C4' to C12'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C13'), 14.6 (CH₃, C14'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 390.3007 (calcd for C₂₄H₄₀NO₃⁺, 390.3003).

(L)-methyl oleoylphenylalaninate (**9**). The compound was obtained as yellow oil (47%). $[\alpha]_D^{20} = +60.0^\circ$ (c 0.1, MeOH); ¹H-NMR (CD₃OD, 300MHz) δ 7.24 (m, 5H, H5 to H7), 5.35 (m, 2H, H9'-H10'), 4.68 (dd, *J* = 9.5, 5.5 Hz, 1H, H2), 3.70 (s, 3H, H8), 3.16 (dd, *J* = 14.0, 5.5 Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, *J* = 14.0, 9.4 Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H2'), 2.03 (m, 4H, H8'-H11'), 1.49 (qt, *J* = 7.5, 2H, H3'), 1.29 (br s, 20H, H4' to H7'-H12' to H16'), 0.90 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, H18'); ¹³C-NMR (CD₃OD, 125MHz) δ 176.4 (C, C1), 174.5 (C, C1'), 138.5 (C, C4), 131.0 (CH, C9'-C10'), 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 55.2 (CH₂, C2), 52.8 (CH₃, C8), 38.5 (CH₂, C3), 36.8 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C4'to C7' and C12' to C16'), 31.0-30.2 (CH₂, C4'to C7' and C12' to C16'), 28.3 (CH₂, C8'-C11'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C17'), 14.6 (CH₃, C18'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 444.3477 (calcd for C₂₈H₄₆NO₃⁺, 444.3472).

(L)-methyl (E)-octadec-9-enoylphenylalaninate (**10**). The compound was obtained as a white powder (74%). $[\alpha]_D^{20} = -58.0^\circ$ (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 300MHz) δ 7.24 (m, 5H, H5 to H7), 5.39 (m, 2H, H9'-H10'), 4.68 (dd, *J* = 9.4, 5.5 Hz, 1H, H2), 3.69 (s, 3H, H8), 3.16 (dd, *J* = 13.9, 5.5 Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, *J* = 13.8, 9.3 Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H2'), 1.97 (m, 4H, H8'-H11'), 1.49 (qt, *J* = 7.35, 2H, H3'), 1.29 (br s, 20H, H4' to H7'-H12' to H16'), 0.90 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, H18'); ¹³C NMR (CD₃OD, 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 174.8 (C, C1'), 138.4 (C, C4), 131.0 (CH, C9'-C10'), 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 55.2 (CH₂, C2), 52.8 (CH₃, C8), 38.5 (CH₂, C3), 36.8 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C4'to C7' and C12' to C16'), 31.0-30.2 (CH₂, C4'to C7' and C12' to C16'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.8 (CH₂, C17'), 14.5 (CH₃, C18'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 444.3482 (calcd for C₂₈H₄₆NO₃⁺, 444.3472).

(L)-methyl stearoylphenylalaninate (**11**). The compound was obtained as a white powder (40%). $[\alpha]_D^{20} = -63.0^\circ$ (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 4.68 (dd, *J* = 9.1, 5.4 Hz, 1H, H2), 3.69 (s, 3H, H8), 3.16 (dd, *J* = 13.9, 5.4 Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, *J* = 13.7, 9.5 Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H2'), 1.49 (qt, *J* = 7.4, 2H, H3'), 1.29 (br s, 28H, H4' to H17'), 0.90 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H18'); ¹³C NMR (CD₃OD, 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 173.8 (C, C1'), 138.4 (C, C4), 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 55.2 (CH₂, C2), 52.8 (CH₃, C8), 38.5 (CH₂, C3), 36.9 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C4'to C16'), 30.9-30.2 (CH₂, C4' to C16'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C17'), 14.6 (CH₃, C18'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 446.3630 (calcd for C₂₈H₄₈NO₃⁺, 446.3629).

(D)-methyl palmitoylphenylalaninate (**12**). The compound was obtained as a white powder (40%). $[\alpha]_D^{20} = -67.0^\circ$ (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ 7.24 (m, 5H, H5 to H7), 4.68 (dd, *J* = 9.5, 5.5 Hz, 1H, H2), 3.69 (s, 3H, H8), 3.16 (dd, *J* = 13.9, 5.5 Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, *J* = 13.9, 9.3 Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H2'), 1.49 (qt, *J* = 7.5, 2H,

H3'), 1.29 (br s, 20H, H4' to H15'), 0.90 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H16'); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125MHz) δ 176.4 (C, C1), 173.8 (C, C1'), 138.5 (C, C4), 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 55.2 (CH_2 , C2), 52.8 (C, C8), 38.5 (CH_2 , C3), 36.8 (C, C2'), 33.2 (CH_2 , C3' to C14'), 30.9-30.2 (CH_2 , C3' to C14'), 27.0 (CH_2 , C3'), 23.9 (CH_2 , C15'), 14.6 (CH_3 , C16'); HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 418.3526 (calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{NO}_3^+$, 418.3316).

(D)-methyl (Z)-hexadec-9-enoylphenylalaninate (**13**). The compound was obtained as a white powder (27%). $[\alpha]_D^{20} = -49.0$ ° (c 0.1, MeOH); ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 5.35 (m, 2H, H9' to H10'), 4.68 (m, 1H, H2), 3.68 (s, 3H, H8), 3.16 (dd, $J = 13.9, 5.5$ Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, $J = 13.7, 9.5$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H2'), 2.03 (m, 4H, H8' - H11'), 1.49 (qt, $J = 7.3$, 2H, H3'), 1.30 (br s, 16H, H4' to H7' - H12' to H15'), 0.90 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, H16'); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 174.8 (C, C1'), 138.5 (C, C4), 131.0 (CH, C9' - C10'), 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 55.2 (CH_2 , C2), 52.8 (CH_3 , C8), 38.5 (CH_2 , C3), 36.8 (C, C2'), 33.1 (CH_2 , C4' to C7' and C10' to C14'), 31.0-30.2 (CH_2 , C4' to C8' and C11' to C14'), 28.3 (CH_2 , C8' - C11'), 27.0 (CH_2 , C3'), 23.9 (CH_2 , C15'), 14.6 (CH_3 , C16'); HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 416.3175 (calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{NO}_3^+$, 416.3159).

(D)-methyl icosanoylphenylalaninate (**14**). The compound was obtained as a white powder (56%). $[\alpha]_D^{20} = -50.0$ ° (c 0.1, MeOH); ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ 7.30 (m, 3H, H5 to H6), 7.11 (m, 2H, H7), 5.86 (1H, m, H), 4.93 (1H, q, $J = 5.8$ Hz, H), 3.75 (s, 3H, H8), 3.19 (dd, $J = 13.8, 5.6$ Hz, 1H, H3b), 3.11 (dd, $J = 13.9, 5.6$ Hz, 1H, H3a), 2.19 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H2'), 1.60 (m, 2H, H3'), 1.27 (br s, 32H, H4' to H19'), 0.90 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, H20') / ^{13}C NMR (CD_3OD , 125MHz) δ 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 55.2 (CH_2 , C2), 52.8 (CH_3 , C8), 38.5 (CH_2 , C3), 36.8 (C, C2'), 33.2 (CH_2 , C4' to C18'), 30.9-30.2 (CH_2 , C4' to C18'), 27.0 (CH_2 , C3'), 23.9 (CH_2 , C19'), 14.6 (CH_3 , C20') ; HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 474.4183 (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{NO}_3^+$, 474.3942).

(D)-methyl dodecanoylphenylalaninate (**15**). The compound was obtained as a white powder (9.1%). $[\alpha]_D^{20} = -49.0$ ° (c 0.1, MeOH); ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 4.69 (m, 1H, H2), 3.68 (s, 3H, H8), 3.16 (dd, $J = 13.9, 5.5$ Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, $J = 13.9, 9.4$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H2'), 1.49 (qt, $J = 7.5$, 2H, H3'), 1.28 (br s, 16H, H4' to H11'), 0.90 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H, H12') / ^{13}C NMR (CD_3OD , 125MHz) δ 176.4 (C, C1), 173.8 (C, C1'), 138.5 (C, C4), 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 55.2 (CH_2 , C2), 52.8 (CH_3 , C8), 38.5 (CH_2 , C3), 36.8 (C, C2'), 33.2 (CH_2 , C4' to C10'), 30.9-30.2 (CH_2 , C4' to C10'), 27.0 (CH_2 , C3'), 23.9 (CH_2 , C11'), 14.6 (CH_3 , C12'); HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 362.2607 (calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{NO}_3^+$, 362.2690).

(D)-methyl tetradecanoylphenylalaninate (**16**). The compound was obtained as a white powder (98%). $[\alpha]_D^{20} = -87.0$ ° (c 0.1, MeOH); ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ 7.24 (m, 5H, H5 to H7), 4.68 (dd, $J = 9.2, 5.5$ Hz, 1H, H2), 3.69 (s, 3H, H8), 3.16 (dd, $J = 13.7, 5.5$ Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, $J = 13.9, 9.4$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H2'), 1.49 (qt, $J = 7.5$, 2H, H3'), 1.29 (br s, 20H, H4' to H13'), 0.90 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H14'); ^{13}C NMR (CD_3OD ,

125MHz) δ 176.3 (C, C1), 173.8 (C, C1'), 138.4 (C, C4), 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 55.2 (CH₂, C2), 52.8 (CH₃, C8), 38.5 (CH₂, C3), 36.9 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C3'to C12'), 30.9-30.2 (CH₂, C3' to C12'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C13'), 14.6 (CH₃, C14'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 390.3048 (calcd for C₂₄H₄₀NO₃⁺, 390.3003).

(D)-methyl oleoylphenylalaninate (**17**). The compound was obtained as yellow oil (69%). $[\alpha]_D^{20} = -55.0^\circ$ (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 300MHz) δ 7.24 (m, 5H, H5 to H7), 5.35 (m, 2H, H9'-H10'), 4.70 (m, 1H, H2), 3.68 (s, 3H, H8), 3.16 (dd, *J* = 13.5, 4.5 Hz, 1H, H3b), 2.93 (m, 1H, H3a), 2.14 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H2'), 2.03 (m, 4H, H8'-H11'), 1.49 (m, 2H, H3'), 1.29 (br s, 20H, H4' to H7'-H12' to H17'), 0.90 (m, 3H, H18'); ¹³C NMR (CD₃OD, 75MHz) δ 176.2 (C, C1), 173.7 (C, C1'), 138.4 (C, C4), 131.0 (CH, C9'-C10'), 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 55.2 (CH₂, C2), 52.8 (CH₃, C8), 38.5 (CH₂, C3), 36.9 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C4'to C8' and C11' to C16'), 31.0-30.2 (CH₂, C4'to C8' and C11' to C16'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C17'), 14.6 (CH₃, C18'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 444.3483 (calcd for C₂₈H₄₆NO₃⁺, 444.3472).

(D)-methyl (E)-octadec-9-enoylphenylalaninate (**18**). The compound was obtained as a white powder (69%). $[\alpha]_D^{20} = -83.00^\circ$ (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 300MHz) δ 7.24 (m, 5H, H5 to H7), 5.39 (m, 2H, H9'-H10'), 4.68 (dd, *J* = 9.4, 5.5 Hz, 1H, H2), 3.69 (s, 3H, H8), 3.17 (dd, *J* = 13.9, 5.5 Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, *J* = 13.7, 9.5 Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, *J* = 7.35 Hz, 2H, H2'), 1.98 (m, 4H, H8'-H11'), 1.49 (qt, *J* = 7.35, 2H, H3'), 1.29 (br s, 20H, H4' to H7'-H12' to H16'), 0.90 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, H18'); ¹³C NMR (CD₃OD, 75MHz) δ 176.3 (C, C1), 173.8 (C, C1'), 138.5 (C, C4), 131.7 (CH, C9'-C10'), 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 55.2 (CH₂, C2), 52.8 (CH₃, C8), 38.5 (CH₂, C3), 36.8 (C, C2'), 33.7 (CH₂, C4'to C7' and C12' to C16'), 31.0-30.2 (CH₂, C4'to C7' and C12' to C16'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C17'), 14.6 (CH₃, C18'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 444.2983 (calcd for C₂₈H₄₆NO₃⁺, 444.3472).

(D)-methyl stearoylphenylalaninate (**19**). The compound was obtained as a white powder (44%). $[\alpha]_D^{20} = -46.0^\circ$ (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 300MHz) δ 7.24 (m, 5H, H5 to H7), 4.68 (dd, *J* = 9.1, 5.4 Hz, 1H, H2), 3.69 (s, 3H, H8), 3.16 (dd, *J* = 14.0, 5.5 Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, *J* = 13.9, 9.5 Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H2'), 1.49 (qt, *J* = 7.6, 2H, H3'), 1.29 (br s, 28H, H4' to H17'), 0.90 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H, H18'); ¹³C NMR (CD₃OD, 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 173.8 (C, C1'), 138.4 (C, C4), 130.3 (CH, C5), 129.6 (CH, C6), 128.0 (CH, C7), 55.2 (CH₂, C2), 52.8 (CH₃, C8), 38.5 (CH₂, C3), 36.8 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C4'to C16'), 30.9-30.2 (CH₂, C4' to C16'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C17'), 14.6 (CH₃, C18'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 446.3647 (calcd for C₂₈H₄₈NO₃⁺, 446.3629).

(L)-methyl (Z)-hexadec-9-enoylalaninate (**20**). The compound was obtained as a white powder. $[\alpha]_D^{20} = -1.0^\circ$ (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 300MHz) δ 5.35 (m, 2H, H9'-H10'), 4.38 (m, 1H, H2), 3.69 (s, 3H, H4), 2.22 (t, *J* = 7.35 Hz, 2H, H2'), 2.03 (m, 4H, H8'-H11'), 1.60 (m, 2H, H3'), 1.38 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, H3), 1.33 (br s, 16H, H4' to H7' - H12' to H15'), 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H16'); ¹³C NMR (CD₃OD, 75MHz) δ 176.2 (C, C1), 174.9 (C,

C1'), 131.0 (CH, C9'-C10'), 52.8 (CH₃, C4), 49.5 (CH₂, C2), 36.8 (C, C2'), 33.1 (CH₂, C4'to C7' and C10' to C14'), 31.0-30.2 (CH₂, C4'to C7' and C12' to C14'), 28.3 (CH₂, C8'-C11'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C15'), 17.5 (CH₃, C3), 14.6 (CH₃, C16'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 340.2822 (calcd for C₂₀H₃₈NO₃⁺, 340.2846).

(L)-methyl (Z)-hexadec-9-enoyltyrosinate (**21**). The compound was obtained as white oil (68%). [α]_D²⁰ = + 69.0 ° (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 300MHz) δ 7.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H5), 6.69 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H6), 5.34 (m, 2H, H9' - H10'), 4.60 (dd, *J* = 9.0, 5.6 Hz, 1H, H2), 3.68 (s, 3H, H8), 3.05 (dd, *J* = 13.9, 5.6 Hz, 1H, H3b), 2.84 (dd, *J* = 13.9, 9.4 Hz, 1H, H3a), 2.16 (t, *J* = 7.35 Hz, 2H, H2'), 2.03 (m, 4H, H8' - H11'), 1.51 (qt, *J* = 7.5, 2H, H3'), 1.30 (br s, 16H, H4' to H7' - H12' to H15'), 0.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, H16'); ¹³C NMR (CD₃OD, 75MHz) δ 176.3 (C, C1), 173.8 (C, C1'), 157.4 (C, C7), 131.0 (CH, C9'-C10'), 128.8 (C, C4), 116.3 (CH, C6), 55.4 (CH₂, C2), 52.8 (CH₃, C8), 37.7 (CH₂, C3), 36.7 (C, C2'), 33.0 (CH₂, C4'to C7' and C12' to C14'), 31.0-30.2 (CH₂, C4'to C7' and C12' to C14'), 28.2 (CH₂, C8'-C11'), 26.9 (CH₂, C3'), 23.7 (CH₂, C15'), 14.5 (CH₃, C16'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 432.3078 (calcd for C₂₆H₄₂NO₄⁺, 432.3108).

General synthetic procedure for lipoaminoacid synthesis. To a solution of lipoaminoacid methyl ester (50 mg) in methanol (5 mL) and water (0.5 mL) was added LiOH.H₂O (5 equiv.). The reaction mixture was stirred at RT for 4 h aqueous HCl (1M) was added to adjust the pH to 2-3. The resulting mixture was extracted twice with ethyl acetate, dried with Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to provide pure compounds **22-39**.

(L)-palmitoylphenylalanine (**22**). The compound was obtained as a white powder (49%). [α]_D²⁰ = + 66.0 ° (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ 7.24 (m, 5H, H5 to H7), 4.67 (dd, *J* = 9.6, 4.9 Hz, 1H, H2), 3.22 (dd, *J* = 13.9, 4.9 Hz, 1H, H3b), 2.92 (dd, *J* = 13.9, 9.6 Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, *J* = 7.35 Hz, 2H, H2'), 1.48 (qt, *J* = 7.35, 2H, H3'), 1.29 (br s, 22H, H4' to H15'), 0.9 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, H16'); ¹³C NMR (CD₃OD, 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 175.1 (C, C1'), 138.8 (C, C4), 130.4 (CH, C5), 129.5 (CH, C6), 127.9 (CH, C7), 55.0 (CH₂, C2), 38.6 (CH₂, C3), 36.9 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C3'to C14'), 30.9-30.3 (CH₂, C3' to C14'), 27.1 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C15'), 14.6 (CH₃, C16'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 404.3159 (calcd for C₂₅H₄₂NO₃⁺, 404.3159).

(L)-(Z)-hexadec-9-enoylphenylalanine (**23**). The compound was obtained as a white powder (99%). [α]_D²⁰ = + 49.0 ° (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 5.35 (m, 2H, H9' to H10'), 4.68 (dd, *J* = 9.3, 5.5 Hz, 1H, H2), 3.22 (dd, *J* = 13.9, 4.6 Hz, 1H, H3b), 2.94 (dd, *J* = 13.6, 9.4 Hz, 1H, H3a), 2.14 (m, 2H, H2'), 2.03 (m, 4H, H8' - H11'), 1.49 (m, 2H, H3'), 1.30 (br s, 16H, H4' to H7' - H12' to H15'), 0.90 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, H16'); ¹³C NMR (CD₃OD, 125MHz) δ 176.0 (C, C1), 173.8 (C, C1'), 139.1 (C, C4), 131.0 (CH, C9'-C10'), 130.5 (CH, C5), 129.4 (CH, C6), 127.7 (CH, C7), 55.2 (CH₂, C2), 52.8 (CH₃, C8), 38.9 (CH₂, C3), 37.1 (C, C2'), 33.1 (CH₂, C4'to C7' and C10' to C14'), 31.0-30.2 (CH₂,

C4' to C8' and C11' to C14'), 28.3 (CH₂, C8'-C11'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C15'), 14.6 (CH₃, C16'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 402.2986 (calcd for C₂₅H₄₀NO₃⁺, 402.3003).

(L)-icosanoylphenylalanine (**24**). The compound was obtained as a white powder (5%). $[\alpha]_D^{20} = (c\ 0.1, \text{MeOH})$; ¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ 7.30 (m, 3H, H5 to H6), 7.19 (m, 1H, H7), 5.99 (m, 1H, H), 4.83 (m, 1H, H2), 3.27 (dd, *J* = 13.9, 4.6 Hz, 1H, H3b), 3.12 (dd, *J* = 13.7, 6.6 Hz, 1H, H3a), 2.17 (m, 2H, H2'), 1.55 (m, 2H, H3'), 1.28 (br s, 32H, H4' to H11'), 0.93 (t, *J* = 7.17 Hz, 3H, H20') / ¹³C NMR (CD₃OD, 150MHz) 130.6 (CH, C5), 129.4 (CH, C6), 127.7 (CH, C7), 55.2 (CH₂, C2), 39.0 (CH₂, C3), 37.2 (C, C2'), 33.1 (CH₂, C4' to C18'), 30.9-30.3 (CH₂, C4' to C18'), 27.1 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C19'), 14.6 (CH₃, C20') ; HRESI-TOFMS (calcd for C₂₉H₅₀NO₃⁺, 460.3785).

(L)-Dodecanoylphenylalanine (**25**). The compound was obtained as a white powder (44%). $[\alpha]_D^{20} = + 67.0$ (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 4.69 (dd, *J* = 9.5, 4.9 Hz, 1H, H2), 3.22 (dd, *J* = 14.0, 4.9 Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, *J* = 14.0, 9.5 Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H2'), 1.49 (qt, *J* = 7.4, 2H, H3'), 1.29 (br s, 16H, H4' to H11'), 0.90 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, H12'); ¹³C NMR (CD₃OD, 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 175.0 (C, C1'), 138.8 (C, C4), 130.4 (CH, C5), 129.5 (CH, C6), 127.9 (CH, C7), 55.0 (CH₂, C2), 38.6 (CH₂, C3), 37.0 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C3' to C10'), 30.9-30.3 (CH₂, C3' to C10'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C11'), 14.6 (CH₃, C12'); HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 348.2448 (calcd for C₂₁H₃₄NO₃⁺, 348.2533).

(L)- tetradecanoylphenylalanine (**26**). The compound was obtained as a white powder (75%). $[\alpha]_D^{20} = + 80.0$ (0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 4.67 (dd, *J* = 9.5, 4.7 Hz, 1H, H2), 3.22 (dd, *J* = 13.9, 4.7 Hz, 1H, H3b), 2.92 (dd, *J* = 13.9, 9.6 Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H2'), 1.48 (qt, *J* = 7.4, 2H, H3'), 1.29 (br s, 20H, H4' to H13'), 0.9 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H14'); ¹³C NMR (CD₃OD, 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 175.0 (C, C1'), 138.8 (C, C4), 130.4 (CH, C5), 129.5 (CH, C6), 127.9 (CH, C7), 55.0 (CH₂, C2), 38.6 (CH₂, C3), 36.9 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C4' to C12'), 30.9 to 30.2 (CH₂, C4' to C12'), 27.1 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C13'), 14.6 (CH₃, C14') ; HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 376.2792 (calcd for C₂₃H₃₈NO₃⁺, 376.2846).

(L)-oleoylphenylalanine (**27**). The compound was obtained as yellow oil (79%). $[\alpha]_D^{20} = + 56.0$ (0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 500MHz) δ 7.25 (m, 5H, H5 to H7), 5.35 (m, 2H, H9'-H10'), 4.68 (m, 1H, H2), 3.22 (dd, *J* = 13.9, 4.6 Hz, 1H, H3b), 2.92 (dd, *J* = 13.7, 9.8 Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H2'), 2.04 (m, 4H, H8'-H11'), 1.48 (qt, *J* = 7.4 Hz, 2H, H3'), 1.29 (br s, 20H, H4' to H7'-H12' to H17'), 0.90 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H, H18'); ¹³C NMR (CD₃OD, 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 175.0 (C, C1'), 138.8 (C, C4), 131.0 (CH, C9'-C10'), 130.4 (CH, C5), 129.5 (CH, C6), 127.9 (CH, C7), 55.0 (CH₂, C2), 38.6 (CH₂, C3), 36.9 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C4' to C8' and C11' to C16'), 30.9 to 28.3 (CH₂, C4' to C8' and C11' to C16'), 27.1 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C17'), 14.6 (CH₃, C18') ; HRESI-TOFMS [M+H]⁺ *m/z* 430.3315 (calcd for C₂₇H₄₄NO₃⁺, 430.3316).

(L)-(E)-octadec-9-enoylphenylalanine (**28**). The compound was obtained as a white powder (78%). $[\alpha]_D^{20} = + 54.0^\circ$ (0.1, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 5.38 (m, 2H, H9' to H10'), 4.68 (dd, $J = 9.6, 4.9$ Hz, 1H, H2), 3.22 (dd, $J = 13.9, 4.7$ Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, $J = 13.9, 9.6$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H, H2), 1.97 (m, 4H, H8'– H11'), 1.48 (qt, $J = 7.4$, 2H, H3'), 1.28 (br s, 20H, H4' to H11' and H12' to H17'), 0.90 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, H18'); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 175.0 (C, C1'), 138.7 (C, C4), 131.6 (CH, C9'- C10'), 130.4 (CH, C5), 129.5 (CH, C6), 127.9 (CH, C7), 55.0 (CH₂, C2), 38.6 (CH₂, C3), 36.9 (C, C2'), 33.8 (CH₂, C8'- C11'), 33.2 (CH₂, C4'to C7' and C12' to C16'), 30.9- 28.3 (CH₂, C4' to C7' and C12' to C16'), 27.1 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C17'), 14.6 (CH₃, C18') ; HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 430.3307 (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{NO}_3^+$, 430.3316).

(L)- stearoylphenylalanine (**29**). The compound was obtained as a white powder (66%). $[\alpha]_D^{20} = + 49.0^\circ$ (0.1, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 4.7 (dd, $J = 9.5, 4.7$ Hz, 1H, H2), 3.22 (dd, $J = 14.0, 4.7$ Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, $J = 13.9, 9.8$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H2'), 1.48 (qt, $J = 7.4$, 2H, H3'), 1.29 (br s, 28H, H4' to H17'), 0.9 (t, $J = 6.3$ Hz, 3H, H16'); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 175.2 (C, C1'), 138.8 (C, C4), 130.4 (CH, C5), 129.5 (CH, C6), 127.6 (CH, C7), 55.1 (CH₂, C2), 38.6 (CH₂, C3), 37.0 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C4'to C16'), 30.9- 30.3 (CH₂, C4' to C16'), 27.1 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C15'), 14.6 (CH₃, C16') ; HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 432.3528 (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{NO}_3^+$, 432.3472).

(D)-palmitoylphenylalanine (**30**). The compound was obtained as a white powder (47%). $[\alpha]_D^{20} = - 54.0^\circ$ (0.1, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500MHz) δ 7.24 (m, 5H, H5 to H7), 4.68 (dd, $J = 9.4, 4.9$ Hz, 1H, H2), 3.22 (dd, $J = 13.9, 4.7$ Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, $J = 13.9, 9.6$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, $J = 7.35$ Hz, 2H, H2'), 1.48 (qt, $J = 7.5$, 2H, H3'), 1.29 (br s, 22H, H4' to H15'), 0.9 (t, $J = 6.2$ Hz, 3H, H16'); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 175.1 (C, C1'), 138.8 (C, C4), 130.4 (CH, C5), 129.5 (CH, C6), 127.9 (CH, C7), 55.1 (CH₂, C2), 38.6 (CH₂, C3), 36.9 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C4'to C14'), 30.9 to 30.3 (CH₂, C4' to C14'), 27.1 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C15'), 14.6 (CH₃, C16') ; HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 404.3174 (calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{NO}_3^+$, 404.3159).

(D)-(Z)-hexadec-9-enoylphenylalanine (**31**). The compound was obtained as a white powder (77%). $[\alpha]_D^{20} = - 49.0^\circ$ (0.1, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 5.34 (m, 2H, H9' to H10'), 4.67 (m, 1H, H2), 3.22 (dd, $J = 13.9, 4.6$ Hz, 1H, H3b), 2.94 (dd, $J = 13.7, 9.5$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (m, 2H, H2'), 2.03 (m, 4H, H8' - H11'), 1.49 (m, 2H, H3'), 1.30 (br s, 16H, H4' to H7' - H12' to H15'), 0.90 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H16'); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125MHz) δ 176.0 (C, C1), 173.8 (C, C1'), 138.9 (C, C4), 131.0 (CH, C9'–C10'), 130.4 (CH, C5), 129.5 (CH, C6), 127.8 (CH, C7), 55.2 (CH₂, C2), 52.8 (CH₃, C8), 38.7 (CH₂, C3), 37.0 (C, C2'), 33.1 (CH₂, C4'to C7' and C10' to C14'), 31.0-30.2 (CH₂, C4'to C8' and C11' to C14'), 28.3 (CH₂, C8'-C11'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C15'), 14.6 (CH₃, C16'); HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 402.2977 (calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{NO}_3^+$, 402.3003).

(D)-icosanoylphenylalanine (**32**). The compound was obtained as a white powder (%). $[\alpha]_D^{20} = -22.0^\circ$ (0.1, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600MHz) δ 7.30 (m, 3H, H5 to H6), 7.19 (m, 1H, H7), 5.95 (m, 1H, H), 4.85 (m, 1H, H2), 3.27 (dd, $J = 14.0, 4.9$ Hz, 1H, H3b), 3.13 (dd, $J = 14.0, 6.4$ Hz, 1H, H3a), 2.18 (m, 2H, H2'), 1.56 (m, 2H, H3'), 1.28 (br s, 32H, H4' to H11'), 0.93 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H20') / $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 150MHz) 175.7 (C, C1), 173.4 (C, C1'), 139.5 (C, C4), 130.6 (CH, C5), 129.3 (CH, C6), 127.5 (CH, C7), 56.5 (CH₂, C2), 39.2 (CH₂, C3), 37.3 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C4'to C18'), 30.9-30.5 (CH₂, C4' to C18'), 27.1 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C19'), 14.6 (CH₃, C20') ; HRESI-TOFMS (calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{NO}_3^+$, 460.3785).

(D)-Dodecanoylphenylalanine (**33**). The compound was obtained as a white powder (38%). $[\alpha]_D^{20} = -68.0^\circ$ (0.1, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 4.67 (dd, $J = 9.1, 4.7$ Hz, 1H, H2), 3.22 (dd, $J = 14.0, 4.7$ Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, $J = 14.0, 9.5$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H2'), 1.49 (qt, $J = 7.6, 2\text{H}$, H3'), 1.29 (br s, 16H, H4' to H11'), 0.90 (t, $J = 6.5$ Hz, 3H, H12') ; / $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125MHz) 176.1 (C, C1), 175.2 (C, C1'), 138.7 (C, C4), 130.3 (CH, C5), 129.4 (CH, C6), 127.7 (CH, C7), 55.1 (CH₂, C2), (38.5 (CH₂, C3), 36.9 (C, C2'), 33.1 (CH₂, C3'to C10'), 30.9-30.2 (CH₂, C3' to C10'), 27.0 (CH₂, C3'), 23.7 (CH₂, C11'), 14.6 (CH₃, C12') ; HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 348.2521 (calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{NO}_3^+$, 348.2533).

(D)- tetradecanoylphenylalanine (**34**). The compound was obtained as a white powder (71%). $[\alpha]_D^{20} = -64.0^\circ$ (0.1, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 4.67 (dd, $J = 9.6, 4.9$ Hz, 1H, H2), 3.22 (dd, $J = 14.0, 4.7$ Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, $J = 13.9, 9.6$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H2'), 1.48 (qt, $J = 7.4$ Hz, 2H, H3'), 1.29 (br s, 20H, H4' to H13'), 0.90 (t, $J = 6.5$ Hz, 3H, H14') ; $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 175.05 (C, C1'), 138.8 (C, C4), 130.4 (CH, C5), 129.5 (CH, C6), 127.9 (CH, C7), 55.0 (CH₂, C2), 38.6 (CH₂, C3), 37.0 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C3'to C12'), 30.9- 30.3 (CH₂, C3' to C12'), 27.1 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C13'), 14.6 (CH₃, C14') ; HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 376.2830 (calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{NO}_3^+$, 376.2846).

(D)-oleoylphenylalanine (**35**). The compound was obtained as yellow oil (80%). $[\alpha]_D^{20} = -41.0^\circ$ (0.1, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 5.35 (m, 2H, H9'- H10'), 4.68 (m, 1H, H2), 3.22 (dd, $J = 13.9, 4.7$ Hz, 1H, H3b), 2.93 (dd, $J = 13.9, 9.8$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H2'), 2.03 (m, 4H, H8'- H11'), 1.49 (qt, $J = 7.4$ Hz, 2H, H3'), 1.29 (br s, 20H, H4' to H7'- H12' to H17'), 0.90 (t, $J = 6.5$ Hz, 3H, H18') ; $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125MHz) δ 176.2 (C, C1), 175.0 (C, C1'), 138.7 (C, C4), 131.0 (CH, C9' - C10'), 130.4 (CH, C5), 129.5 (CH, C6), 127.9 (CH, C7), 55.0 (CH₂, C2), 38.5 (CH₂, C3), 36.9 (C, C2'), 33.2 (CH₂, C4'to C8' and C11' to C16'), 31.0- 30.2 (CH₂, C4'to C8' and C11' to C16'), 27.1 (CH₂, C3'), 23.9 (CH₂, C17'), 14.6 (CH₃, C18') ; HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 430.3284 (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{NO}_3^+$, 430.3316).

(D)-(E)-octadec-9-enoylphenylalanine (**36**). The compound was obtained as a white powder (80%). $[\alpha]_D^{20} = -70.0^\circ$ (0.1, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 5.39 (m, 2H, H9'- H10'), 4.68 (dd, $J = 9.6, 4.9$ Hz, 1H, H2), 3.22 (dd, $J = 14.0, 4.7$ Hz,

1H, H3b), 2.92 (dd, $J = 13.9, 9.8$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H2'), 1.97 (m, 4H, H8' - H11'), 1.48 (qt, $J = 7.4$ Hz, 2H, H3'), 1.29 (br s, 20H, H4' to H7' - H12' to H17'), 0.90 (t, $J = 6.5$ Hz, 3H, H18'); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 175.0 (C, C1'), 138.7 (C, C4), 131.6 (CH, C9' - C10'), 130.4 (CH, C5), 129.5 (CH, C6), 127.9 (CH, C7), 55.0 (CH_2 , C2), 38.6 (CH_2 , C3), 36.9 (C, C2'), 33.8 (CH_2 , C8' - C11'), 33.2 (CH_2 , C4'to C7' and C12' to C16'), 30.9- 30.2 (CH_2 , C4'to C7' and C12' to C16'), 27.1 (CH_2 , C3'), 23.9 (CH_2 , C17'), 14.6 (CH_3 , C18') ; HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 430.3310 (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{NO}_3^+$, 430.3316).

(D)-stearoylphenylalanine (**37**). The compound was obtained as a white powder (32%). $[\alpha]_D^{20} = -50.0^\circ$ (0.1, MeOH); ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ 7.23 (m, 5H, H5 to H7), 5.39 (m, 2H, H9' - H10'), 4.68 (dd, $J = 9.6, 4.9$ Hz, 1H, H2), 3.22 (dd, $J = 14.0, 4.7$ Hz, 1H, H3b), 2.92 (dd, $J = 13.9, 9.8$ Hz, 1H, H3a), 2.14 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H2'), 1.97 (m, 4H, H8' - H11'), 1.48 (qt, $J = 7.4$ Hz, 2H, H3'), 1.29 (br s, 28H, H4' to H7' - H12' to H17'), 0.90 (t, $J = 6.5$ Hz, 3H, H18'); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125MHz) δ 176.3 (C, C1), 175.0 (C, C1'), 138.7 (C, C4), 131.7 (CH, C9' - C10'), 130.4 (CH, C5), 129.5 (CH, C6), 127.9 (CH, C7), 55.0 (CH_2 , C2), 38.6 (CH_2 , C3), 36.9 (C, C2'), 33.8 (CH_2 , C8' - C11'), 33.2 (CH_2 , C4'to C7' and C12' to C16'), 30.9-30.2 (CH_2 , C4'to C7' and C12' to C16'), 27.1 (CH_2 , C3'), 23.9 (CH_2 , C17'), 14.6 (CH_3 , C18') ; HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 432.3507 (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{NO}_3^+$, 432.3472).

(L)-(Z)-hexadec-9-enoylalanine (**38**). The compound was obtained as white oil (%). $[\alpha]_D^{20} = +1.0^\circ$ (0.1, MeOH); ^1H NMR (CD_3OD , 500MHz) δ 5.34 (m, 2H, H9' - H10'), 4.37 (q, $J = 7.3$ Hz, 1H, H2), 2.28 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H2'), 2.03 (m, 4H, H8' - H11'), 1.61 (m, 2H, H3'), 1.40 (d, $J = 7.4$ Hz, 3H, H3), 1.30 (br s, 16H, H4' to H7' - H12' to H15'), 0.90 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H16')/ ^{13}C NMR (CD_3OD , 125MHz) δ 176.4 (C, C1), 176.1 (C, C1'), 131.0 (CH, C9' - C10'), 50.2 (CH_2 , C2), 52.6 (CH_3 , C8), 36.9 (C, C2'), 33.1 (CH_2 , C4'to C7' and C12' to C14'), 31.0 (CH_2 , C8'-C11'), 30.5-28.3 (CH_2 , C4'to C7' and C12' to C14'), 26.9 (CH_2 , C3'), 23.8 (CH_2 , C15'), 17.9 (CH_3 , C3), 14.5 (CH_3 , C16'); HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 326.2619 (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{NO}_3^+$, 326.2690).

(L)-(Z)-hexadec-9-enoyltyrosine (**39**). The compound was obtained as a white powder (%). $[\alpha]_D^{20} = +53.0^\circ$ (0.1, MeOH); ^1H -NMR (CD_3OD , 500MHz) δ 7.03 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H5), 6.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H6), 5.34 (m, 2H, H9' - H10'), 4.60 (dd, $J = 8.8, 5.5$ Hz, 1H, H2), 3.11 (dd, $J = 14.0, 4.9$ Hz, 1H, H3b), 2.84 (dd, $J = 13.9, 9.4$ Hz, 1H, H3a), 2.16 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H2'), 2.03 (m, 4H, H8' - H11'), 1.51 (qt, $J = 7.5, 2\text{H}$, H3'), 1.30 (br s, 16H, H4' to H7' - H12' to H15'), 0.90 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H16'); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75MHz) δ 176.2 (C, C1), 173.9 (C, C1'), 157.3 (C, C7), 131.0 (CH, C9' - C10'), 130.1 (C, C4), 116.2 (CH, C6), 55.4 (CH_2 , C2), 52.6 (CH_3 , C8), 37.7 (CH_2 , C3), 36.9 (C, C2'), 33.0 (CH_2 , C4'to C7' and C12' to C14'), 31.0 (CH_2 , C8'-C11'), 30.5-28.2 (CH_2 , C4'to C7' and C12' to C14'), 26.9 (CH_2 , C3'), 23.7 (CH_2 , C15'), 14.5 (CH_3 , C16'); HRESI-TOFMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 418.2500 (calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{NO}_4^+$, 418.2952).

4.5. Biological assays

4.4.1. Evaluation of larvicidal activity. Insect collection and rearing

Aedes aegypti strain was used for testing the extracts and the compounds. The laboratory strain Paea, came from French Polynesia and has been maintained for a decade at the Institut Pasteur de la Guyane, in French Guiana. This strain is susceptible to all insecticides. *Ae. aegypti* eggs were conserved on dried paper strips. Hatching was produced by dropping these strips in water and placing them under vacuum pression for at least 1 hour. Larvae were fed with yeast pellets. Larval rearing was performed under natural conditions at 28°C +/- 2 °C, 80% +/- 20% RH with a photoperiod 14:10 h dark and light cycles. Late third or early fourth-instar larvae were used in the tests.

All crude extract and fractions were investigated using the WHO procedure for testing mosquito larvicides.¹³ The larvicidal activity of pure compounds was evaluated using a tube assay.

4.4.2. Cup assays

A total of 100 larvae were exposed in each bioassay. Four replicates of 25 larvae were prepared in cups containing 99 mL of distilled water. An aliquot of 1 mL of extract/fractions at the desired concentration in absolute ethanol was added to each cup. The crude extract and the fractions were both tested at 100 ppm. Negative-control treatment was performed for each test with 1 mL of absolute ethanol. Larval mortality was recorded 24 h after exposure.

4.4.3. Tube assays

Ten replicates per concentration were prepared, each containing 50 larvae (10 tests tubes x 5 larvae). Each compound was tested at 10 µg/mL. A stock solution was prepared at 1 mg/mL in absolute ethanol, then 30 µL was added to each test tubes (75 x 12 x 0.8-1.0 soda rimLess, catalog #212-0013, VWR, International) containing 2.97 mL of distilled water. Larval mortality was recorded at 24 h after exposure.

4.4.4. Statistical analysis

Abbott's formula was applied to mortalities if mortality in control was between 5 and 20%. The test was invalidated if mortality in control was greater than 20%.¹⁴

4.4.5. Antimicrobial assays

The ATCC strains were purchased at Pasteur Institute and clinical isolate provided by Phillipe Loiseau (Univ. Paris Sud). The strains used in this study were: *Candida albicans* ATCC10231, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC33591 and *Trichophyton rubrum* SNB-TR1. Extracts, fractions and pure compounds were tested according to the reference protocol of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.¹⁵ The MIC value was obtained after 24 h for bacteria, 48 h for yeast and 5 days for *T. rubrum*.

Acknowledgements

This research was part of the Laboratory of Excellence « Centre d'étude de la Biodiversité Amazonienne » (Labex CEBA, (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01). The

authors are very grateful to C. Gourmel (BioSavane association) for collecting the infected insects and C. Duplais to transfer the biological material.

A. Supporting information

Supplementary data (NMR data of all compounds as well as MS data) associated with this article are available online.

References

1. Good IM. The epidemiology of antibiotic resistance. *Int J of Antimicrob Agent*. 2008; 32:S2-S9.
2. Pilacik N, Kaminska T, et al. Etiology of bacterial infections and incidence of comorbidities in patients with tuberculosis, treated in Mazovian Treatment Centre of Tuberculosis and Lung Diseases during years 2012-2014. *Wiad Lek*. 2015; 68:347–353.
3. Ventola CL, MS. The Antibiotic resistance. *Pharm Ther*. 2015; 40:277–283.
4. World Health Organization. (Accessed June 2017).
5. Kraemer MUG, Sinka ME, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Ecol Epidemiol Glob Health*. 2015; 4:e08437.
6. Aktar MdW, Sengupta D, et al. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol*. 2009; 2:1–12.
7. Sokhna C, Ndiath MO, et al. The Changes in Mosquito Vector Behaviour and the Emerging Resistance to Insecticides Will Challenge the Decline of Malaria. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19:902–907.
8. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*. 2016; 79:629-661.
9. Bode HB. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Curr Opin Chem Bio*. 2009; 13:224-230.
10. Frost DJ, Gunstone FD. The PMR analysis of non-conjugated alkenoic and alkynoic acids and esters. *Chem Phys Lipids*. 1975; 15:53–85.
11. Desbois AP, Lebl T, Yan L, Smith VJ. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008; 81:755 – 764
12. Desbois AP, Smith VJ. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 85: 1629 – 1642.
13. World Health Organization. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf (accessed august 2016).
14. Abott WJ. *Econ Entomol*. 1925; 18: 265–267.
15. Rodrigues AMS, Theodoro PNET, Eparvier V, Basset C, Silva MRR, Beauchêne J, Espindola L, Stien D. Search for antifungal compounds from the wood of durable tropical trees. *J Nat Prod*. 2010; 73: 1706 – 1707.

SUPPORTING INFORMATION FOR :

Characterization and structure-activity relationship study of lipoaminoacid and synthetic analogues from *Pantoea* sp. SNB-VECD14B

Seindé Touré ^{a*}, Sandy Desrat ^a, Isabelle Dusfour ^b, Didier Stien ^c, Véronique Eparvier ^{a*}

^a CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), Université Paris-Sud, 91198 Gif-sur-Yvette, France

^b Institut Pasteur de la Guyane (IPG), Unité de Contrôle et Adaptation des Vecteurs, 97306 Cayenne, Guyane française

^c Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

Corresponding authors

* S. Touré. Tel.: +33 1 69 82 36 65; e-mail: seinde.toure@cnrs.fr

* V. Eparvier. Tel.: +33 1 69 82 36 79; e-mail: veronique.eparvier@cnrs.fr

Table of contents

Table S1. Full NMR spectroscopic data for compound **1**
Figure S1. ¹H NMR spectrum for compound **1** in CD₃OD
Figure S2. ¹³C NMR spectrum for compound **1** in CD₃OD
Figure S3. COSY spectrum for compound **1** in CD₃OD
Figure S4. HSQC spectrum for compound **1** in CD₃OD
Figure S5. HMBC spectrum for compound **1** in CD₃OD
Figure S6. HRMS of compound **1** in MeOH

Table S2. Full NMR spectroscopic data for compound **2**
Figure S7. ¹H NMR spectrum for compound **2** in CD₃OD
Figure S8. ¹³C NMR spectrum for compound **2** in CD₃OD
Figure S9. COSY spectrum for compound **2** in CD₃OD
Figure S10. HSQC spectrum for compound **2** in CD₃OD
Figure S11. HMBC spectrum for compound **2** in CD₃OD
Figure S12. HRMS of compound **2** in MeOH

Table S3. Full NMR spectroscopic data for compound **3**
Figure S13. ¹H NMR spectrum for compound **3** in CD₃OD
Figure S14. ¹³C NMR spectrum for compound **3** in CD₃OD
Figure S15. COSY spectrum for compound **3** in CD₃OD
Figure S16. HSQC spectrum for compound **3** in CD₃OD
Figure S17. HMBC spectrum for compound **3** in CD₃OD
Figure S18. HRMS of compound **3** in MeOH
Figure S19. ¹H NMR spectrum for compound **4** in CD₃OD

Figure S20. ^{13}C NMR spectrum for compound **4** in CD_3OD
Figure S21. HRMS of compound **4** in MeOH

Figure S22. ^1H NMR spectrum for compound **5** in CD_3OD
Figure S23. ^{13}C NMR spectrum for compound **5** in CD_3OD
Figure S24. HRMS of compound **5** in MeOH

Figure S25. ^1H NMR spectrum for compound **6** in CD_3OD
Figure S26. ^{13}C NMR spectrum for compound **6** in CD_3OD
Figure S27. HRMS of compound **6** in MeOH

Figure S28. ^1H NMR spectrum for compound **7** in CD_3OD
Figure S29. ^{13}C NMR spectrum for compound **7** in CD_3OD
Figure S30. HRMS of compound **7** in MeOH

Figure S31. ^1H NMR spectrum for compound **8** in CD_3OD
Figure S32. ^{13}C NMR spectrum for compound **8** in CD_3OD
Figure S33. HRMS of compound **8** in MeOH

Figure S34. ^1H NMR spectrum for compound **9** in CD_3OD
Figure S35. ^{13}C NMR spectrum for compound **9** in CD_3OD
Figure S36. HRMS of compound **9** in MeOH

Figure S37. ^1H NMR spectrum for compound **10** in CD_3OD
Figure S38. ^{13}C NMR spectrum for compound **10** in CD_3OD
Figure S39. HRMS of compound **10** in MeOH

Figure S40. ^1H NMR spectrum for compound **11** in CD_3OD
Figure S41. ^{13}C NMR spectrum for compound **11** in CD_3OD
Figure S42. HRMS of compound **11** in MeOH

Figure S43. ^1H NMR spectrum for compound **12** in CD_3OD
Figure S44. ^{13}C NMR spectrum for compound **12** in CD_3OD
Figure S45. HRMS of compound **12** in MeOH

Figure S46. ^1H NMR spectrum for compound **13** in CD_3OD
Figure S47. ^{13}C NMR spectrum for compound **13** in CD_3OD
Figure S48. HRMS of compound **13** in MeOH

Figure S49. ^1H NMR spectrum for compound **14** in CD_3OD
Figure S50. ^{13}C NMR spectrum for compound **14** in CD_3OD
Figure S51. HRMS of compound **14** in MeOH

Figure S52. ^1H NMR spectrum for compound **15** in CD_3OD
Figure S53. ^{13}C NMR spectrum for compound **15** in CD_3OD
Figure S54. HRMS of compound **15** in MeOH

Figure S55. ^1H NMR spectrum for compound **16** in CD_3OD
Figure S56. ^{13}C NMR spectrum for compound **16** in CD_3OD

Figure S57. HRMS of compound **16** in MeOH

Figure S58. ¹H NMR spectrum for compound **17** in CD₃OD

Figure S59. ¹³C NMR spectrum for compound **17** in CD₃OD

Figure S60. HRMS of compound **17** in MeOH

Figure S61. ¹H NMR spectrum for compound **18** in CD₃OD

Figure S62. ¹³C NMR spectrum for compound **18** in CD₃OD

Figure S63. HRMS of compound **18** in MeOH

Figure S64. ¹H NMR spectrum for compound **19** in CD₃OD

Figure S65. ¹³C NMR spectrum for compound **19** in CD₃OD

Figure S66. HRMS of compound **19** in MeOH

Figure S67. ¹H NMR spectrum for compound **20** in CD₃OD

Figure S68. ¹³C NMR spectrum for compound **20** in CD₃OD

Figure S69. HRMS of compound **20** in MeOH

Figure S70. ¹H NMR spectrum for compound **21** in CD₃OD

Figure S71. ¹³C NMR spectrum for compound **21** in CD₃OD

Figure S72. HRMS of compound **21** in MeOH

Figure S73. ¹H NMR spectrum for compound **22** in CD₃OD

Figure S74. ¹³C NMR spectrum for compound **22** in CD₃OD

Figure S75. HRMS of compound **22** in MeOH

Figure S76. ¹H NMR spectrum for compound **23** in CD₃OD

Figure S77. ¹³C NMR spectrum for compound **23** in CD₃OD

Figure S78. HRMS of compound **23** in MeOH

Figure S79. ¹H NMR spectrum for compound **24** in CD₃OD

Figure S80. ¹³C NMR spectrum for compound **24** in CD₃OD

Figure S81. HRMS of compound **24** in MeOH

Figure S82. ¹H NMR spectrum for compound **25** in CD₃OD

Figure S83. ¹³C NMR spectrum for compound **25** in CD₃OD

Figure S84. HRMS of compound **25** in MeOH

Figure S85. ¹H NMR spectrum for compound **26** in CD₃OD

Figure S86. ¹³C NMR spectrum for compound **26** in CD₃OD

Figure S87. HRMS of compound **26** in MeOH

Figure S88. ¹H NMR spectrum for compound **27** in CD₃OD

Figure S89. ¹³C NMR spectrum for compound **27** in CD₃OD

Figure S90. HRMS of compound **27** in MeOH

Figure S91. ¹H NMR spectrum for compound **28** in CD₃OD

Figure S92. ¹³C NMR spectrum for compound **28** in CD₃OD

Figure S93. HRMS of compound **28** in MeOH

Figure S94. ¹H NMR spectrum for compound **29** in CD₃OD

Figure S95. ¹³C NMR spectrum for compound **29** in CD₃OD

Figure S96. HRMS of compound **29** in MeOH

Figure S97. ¹H NMR spectrum for compound **30** in CD₃OD

Figure S98. ¹³C NMR spectrum for compound **30** in CD₃OD

Figure S99. HRMS of compound **30** in MeOH

Figure S100. ¹H NMR spectrum for compound **31** in CD₃OD

Figure S101. ¹³C NMR spectrum for compound **31** in CD₃OD

Figure S102. HRMS of compound **31** in MeOH

Figure S103. ¹H NMR spectrum for compound **32** in CD₃OD

Figure S104. ¹³C NMR spectrum for compound **32** in CD₃OD

Figure S105. HRMS of compound **32** in MeOH

Figure S106. ¹H NMR spectrum for compound **33** in CD₃OD

Figure S107. ¹³C NMR spectrum for compound **33** in CD₃OD

Figure S108. HRMS of compound **33** in MeOH

Figure S109. ¹H NMR spectrum for compound **34** in CD₃OD

Figure S110. ¹³C NMR spectrum for compound **34** in CD₃OD

Figure S111. HRMS of compound **34** in MeOH

Figure S112. ¹H NMR spectrum for compound **35** in CD₃OD

Figure S113. ¹³C NMR spectrum for compound **35** in CD₃OD

Figure S114. HRMS of compound **35** in MeOH

Figure S115. ¹H NMR spectrum for compound **36** in CD₃OD

Figure S116. ¹³C NMR spectrum for compound **36** in CD₃OD

Figure S117. HRMS of compound **36** in MeOH

Figure S118. ¹H NMR spectrum for compound **37** in CD₃OD

Figure S119. ¹³C NMR spectrum for compound **37** in CD₃OD

Figure S120. HRMS of compound **37** in MeOH

Figure S121. ¹H NMR spectrum for compound **38** in CD₃OD

Figure S122. ¹³C NMR spectrum for compound **38** in CD₃OD

Figure S123. HRMS of compound **38** in MeOH

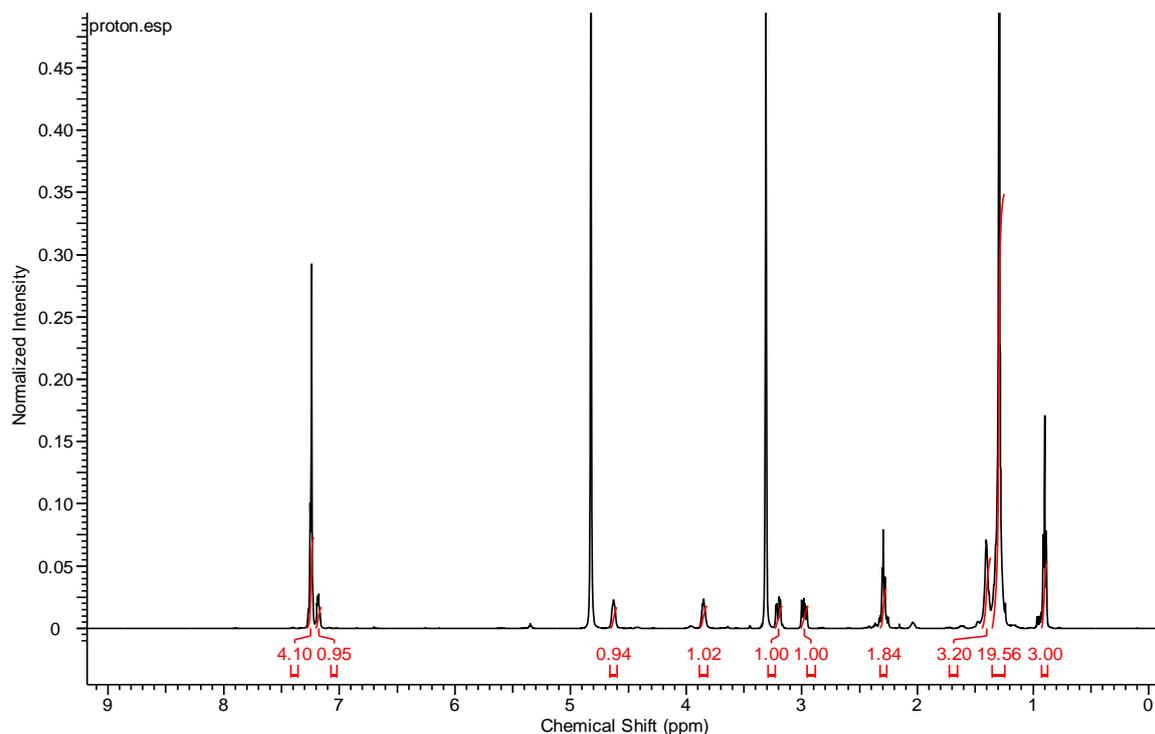
Figure S124. ¹H NMR spectrum for compound **39** in CD₃OD

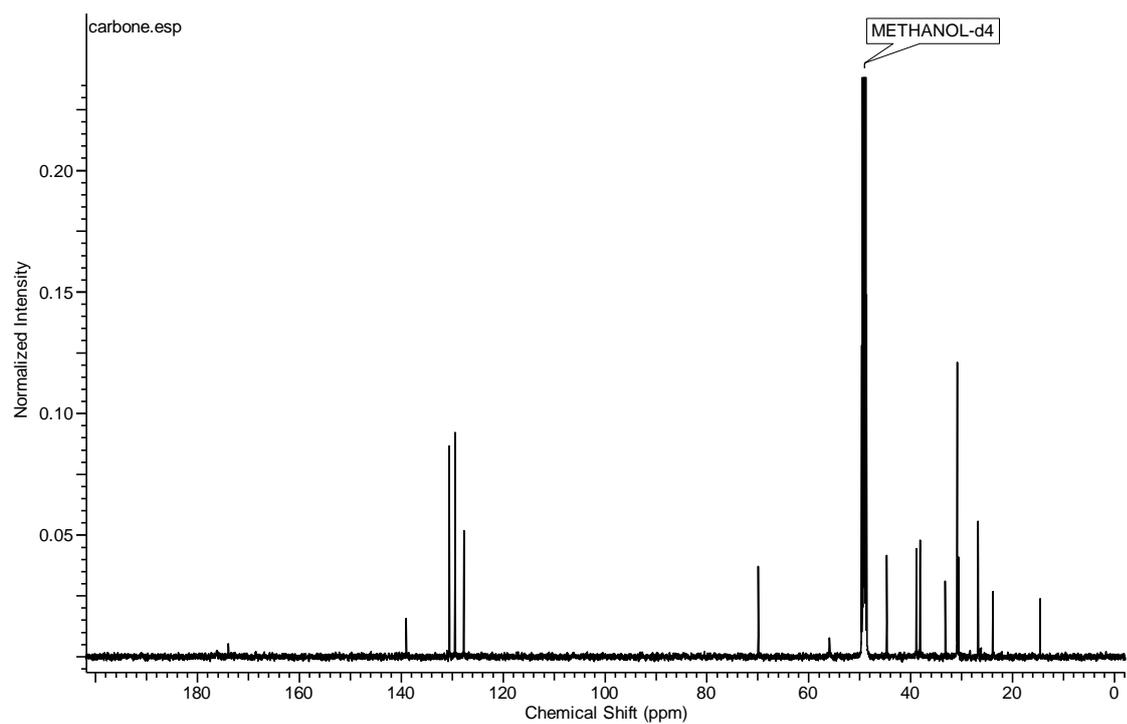
Figure S125. ¹³C NMR spectrum for compound **39** in CD₃OD

Figure S126. HRMS of compound **39** in MeOH

Table S1. Full NMR spectroscopic data for compound **1** in CD₃OD

Position	δ_{C}^a , type	δ_{H}^b , m (<i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC
1	176.02, C			
2	55.9, CH	4.6, m	H3a, H3b	C3, C4
3	38.7, CH ₂	2.98, dd (13.9, 8.2) 3.21, dd (13.9, 4.5)	H2, H3b H2, H3a	C2, C4, C5 C1, C2, C4, C5
4	139.0, C			
5	130.5, CH	7.24, m		C3, C7
6	129.3, CH	7.25, m		C4, C7
7	127.6, CH	7.18, m		C5
1'	173.8, C			
2'	44.6, CH ₂	2.29, dd (14.4, 5.2) 2.34, dd (14.4, 7.4)		C1', C3', C4'
3'	69.6, CH	3.85, m	H2'a, H4'	
4'	38.0, CH ₂	1.40, m	H5'	
5'	30.9, CH ₂	1.29, br s	H4'	
6'	30.9, CH ₂	1.29, br s		
7'	30.9, CH ₂	1.29, br s		
8'	30.9, CH ₂	1.29, br s		
9'	30.9, CH ₂	1.29, br s		
10'	30.9, CH ₂	1.29, br s		
11'	30.9, CH ₂	1.29, br s		
12'	30.9, CH ₂	1.29, br s		
13'	23.6, CH ₂	1.31, m	14'	
14'	14.4, CH ₃	0.90, t (6.8)	13'	13'

**Figure S1.** ¹H NMR spectrum of **1** recorded at 500MHz in CD₃OD.



Figure

S2. ¹³C NMR spectrum of **1** recorded at 125MHz in CD₃OD.

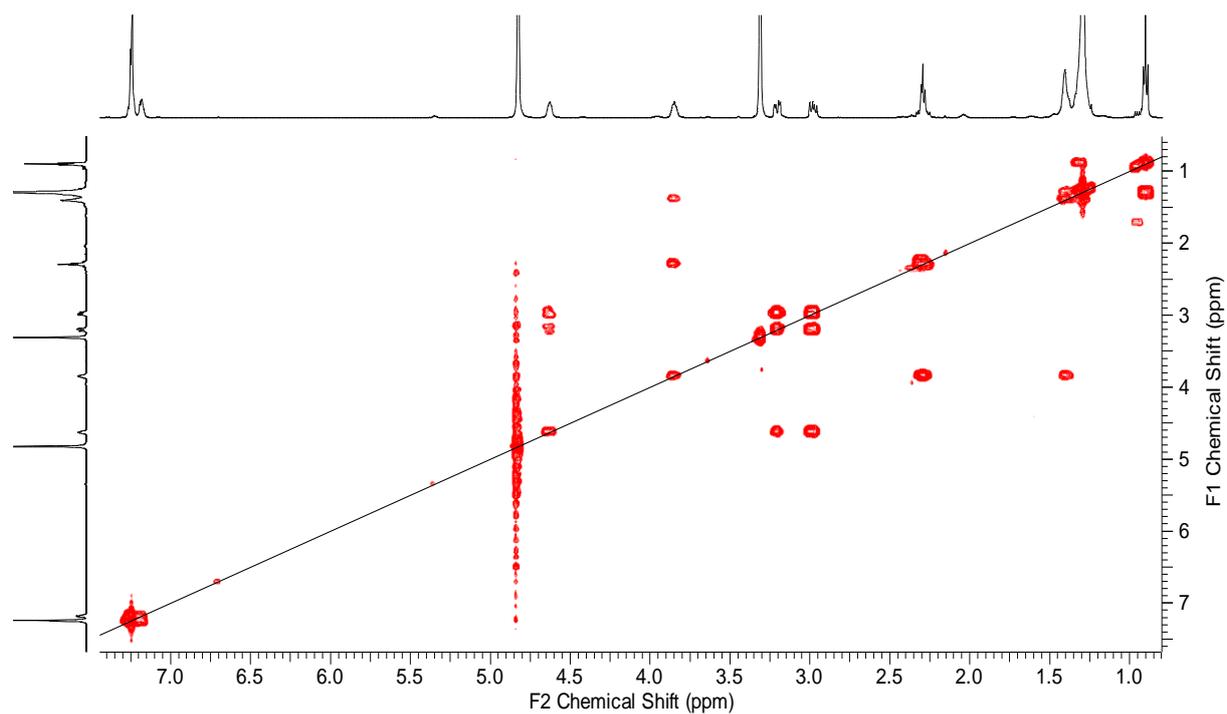


Figure S3. COSY NMR spectrum of **1** recorded at 500MHz in CD₃OD.

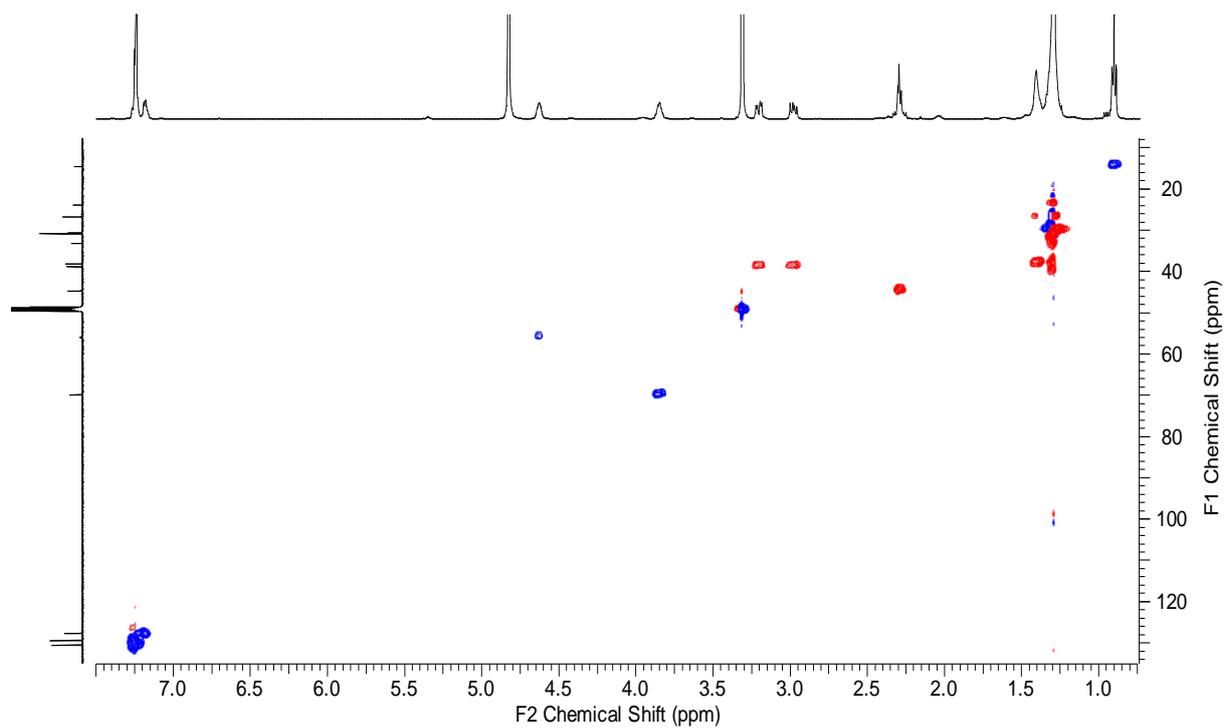


Figure S4. HSQC NMR spectrum of **1** recorded at 500MHz in CD₃OD.

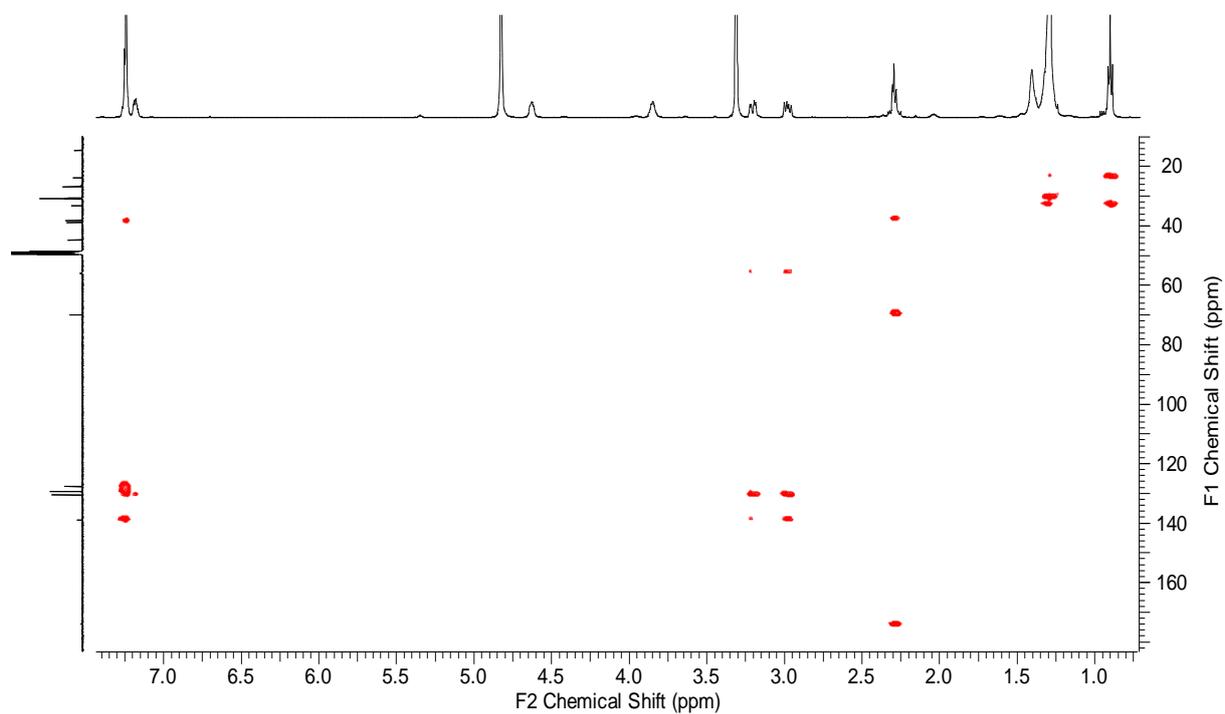


Figure S5. HMBC NMR spectrum of **1** recorded at 500MHz in CD₃OD.

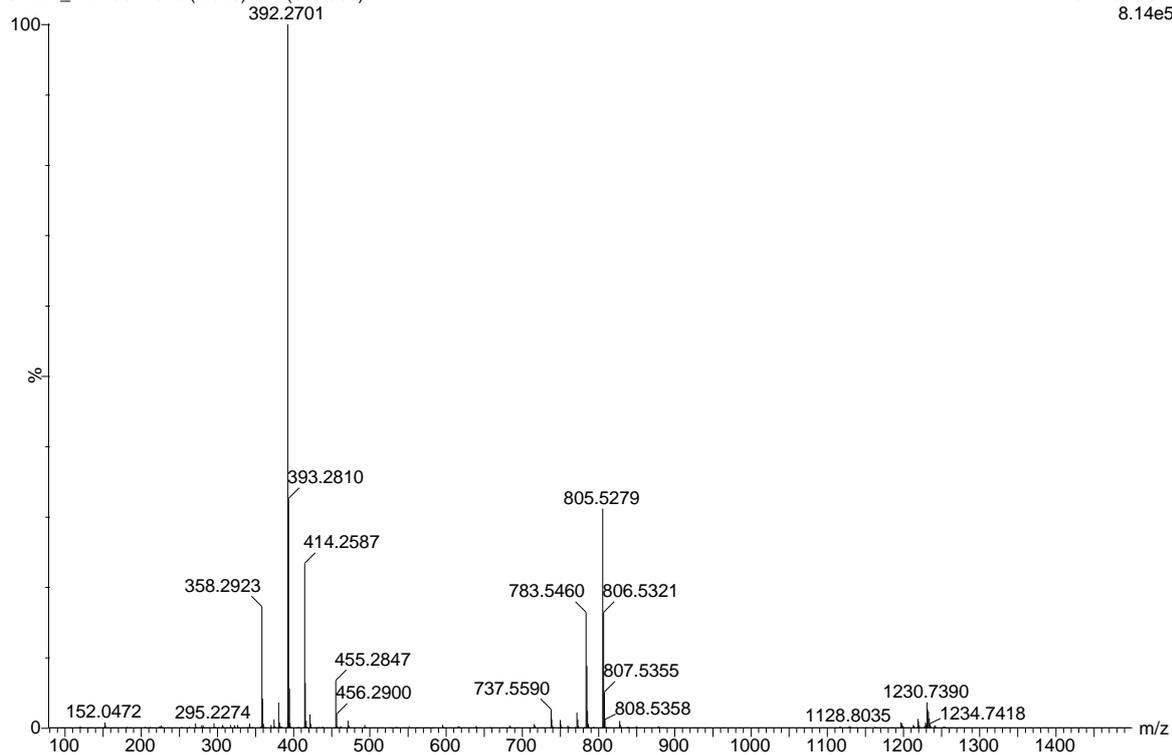


Figure S6. HRMS of compound **1** in MeOH.

Table S2. Full NMR spectroscopic data for compound **2** (VECD14BF5-17) in CD₃OD

Position	δ_c^a , type	δ_H^b , m (J in Hz)	COSY	HMBC
1	176.3, C			
2	57.6, CH	4.53, m	H3	
3	39.4, CH ₂	2.97, dd (14.0, 7.7) 3.21, dd (14.0, 4.5)	H2	C2, C4, C5
4	139.8, C			
5	130.7, CH	7.24, m	H6, H7	C3, C7
6	129.3, CH	7.22, m	H5, H7	C4, C7
7	127.3, CH	7.15, m	H5, H6	C5
1'	173.5, C			
2'	44.9, CH ₂	2.25, dd (14.4, 7.8) 2.30, dd (14.5, 4.9)	H3'	C1', C3', C4' C1', C3', C4'
3'	67.9, CH	3.85, m	H2', H4'	C1'
4'	38.2, CH ₂	1.39, m	H3'	
5'	31.0, CH ₂	1.30, m		C3'
6'	31.0, CH ₂	1.30, m		
7'	31.0, CH ₂	1.30, m		
8'	28.3, CH ₂	2.04, m	H9'	C7', C9'
9'	130.9, CH	5.4, m	H8'	C8'
10'	130.9, CH	5.4, m	H11'	C11'
11'	28.3, CH ₂	2.04, m	H10'	C10', C12'
12'	31.0, CH ₂	1.30, m		
13'	31.0, CH ₂	1.30, m		
14'	31.0, CH ₂	1.30, m		
15'	23.9, CH ₂	1.30, m	H16'	
16'	14.6, CH ₃	0.90, t (6.8)	H15'	C14', C15'

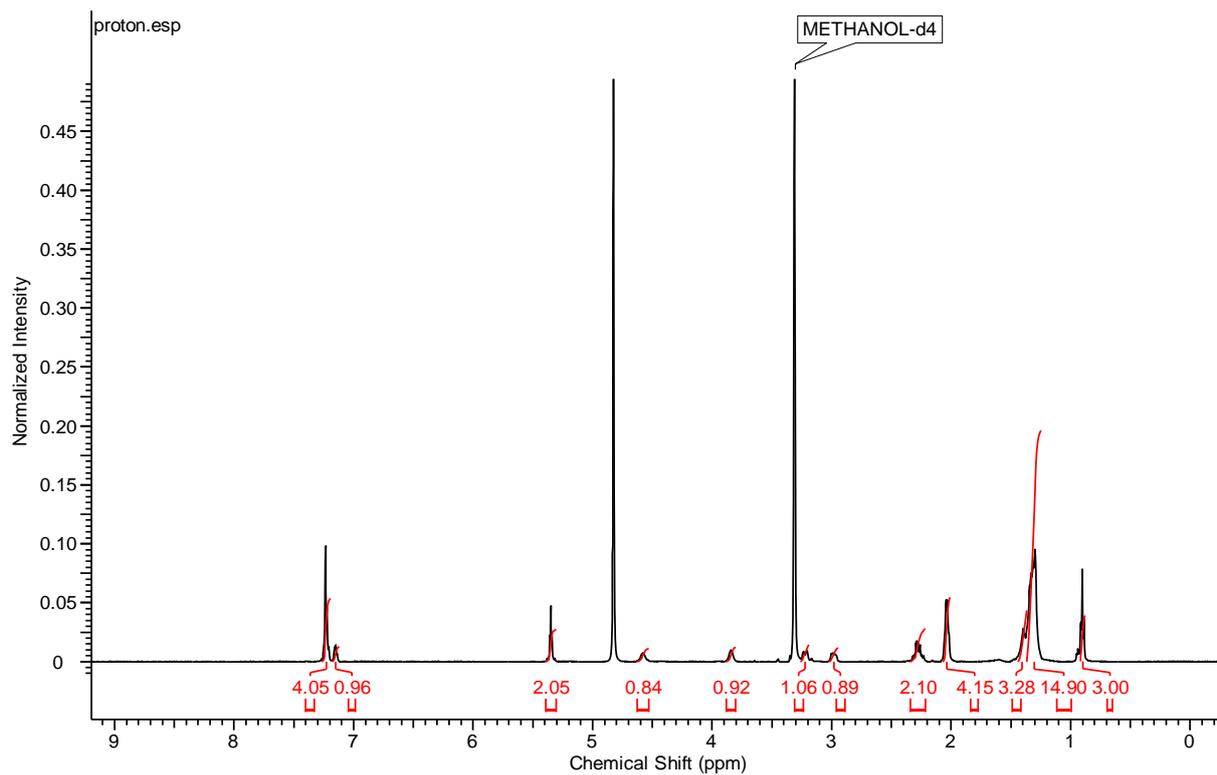


Figure S7. ^1H NMR spectrum of **2** recorded at 500MHz in CD_3OD .

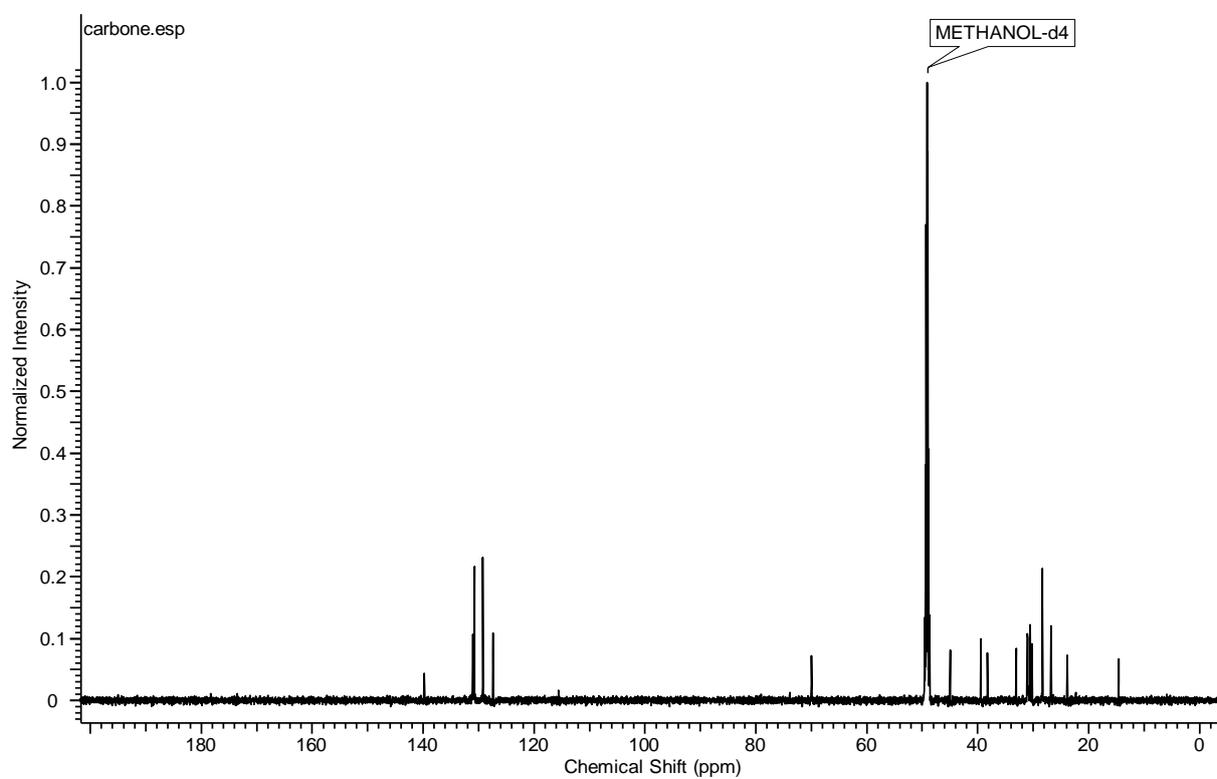


Figure S8. ^{13}C NMR spectrum of **2** recorded at 125MHz in CD_3OD .

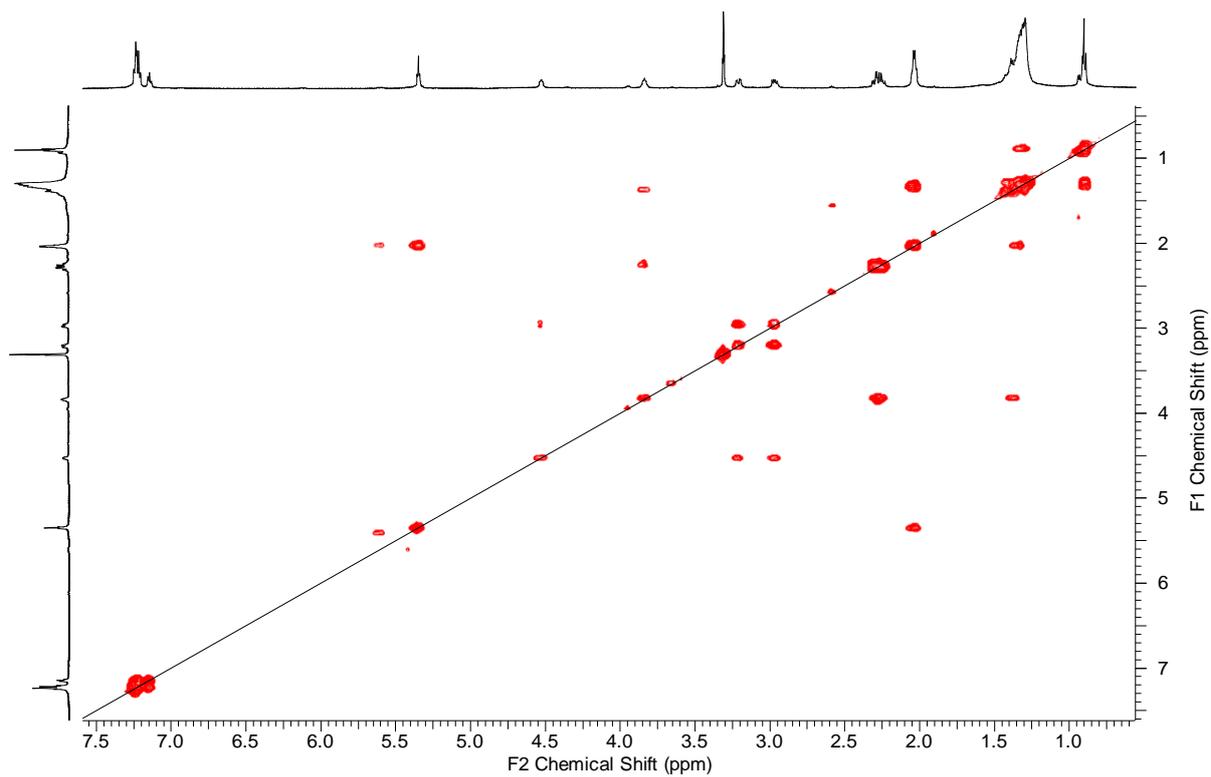


Figure S9. COSY NMR spectrum of **2** recorded at 500MHz in CD₃OD.

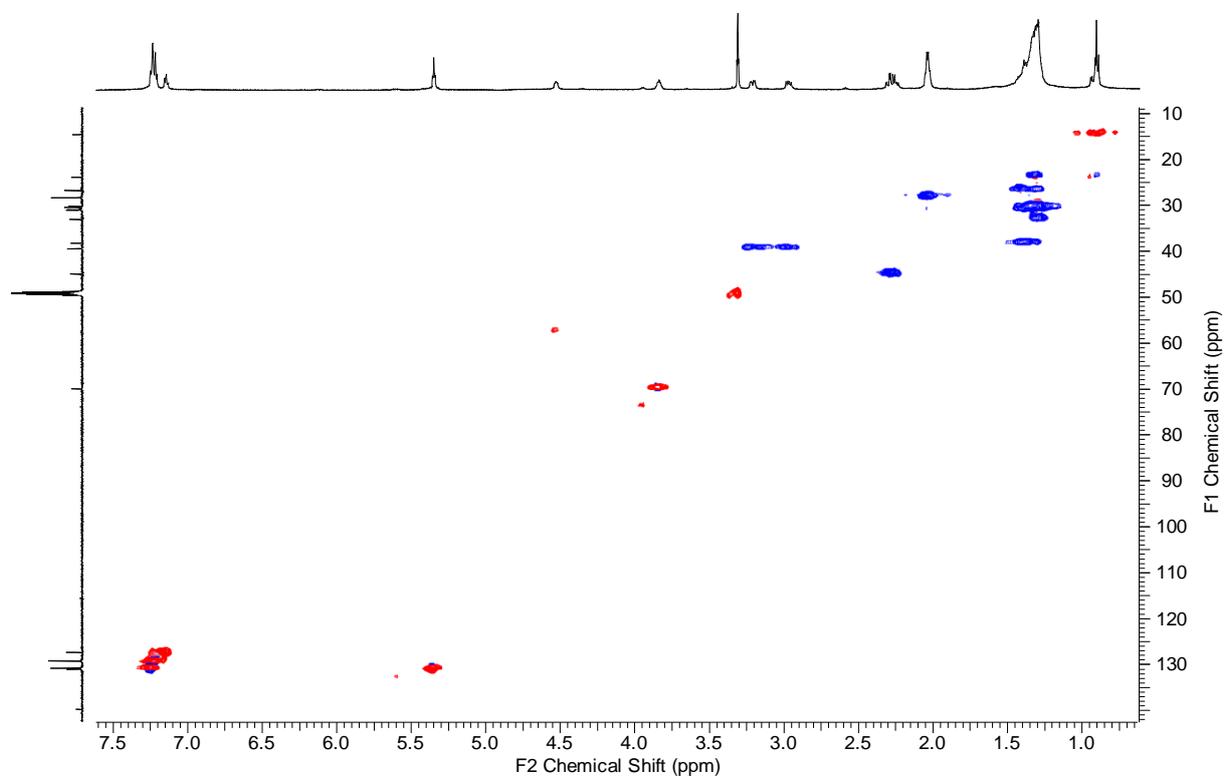


Figure S10. HSQC NMR spectrum of **2** recorded at 500MHz in CD₃OD.

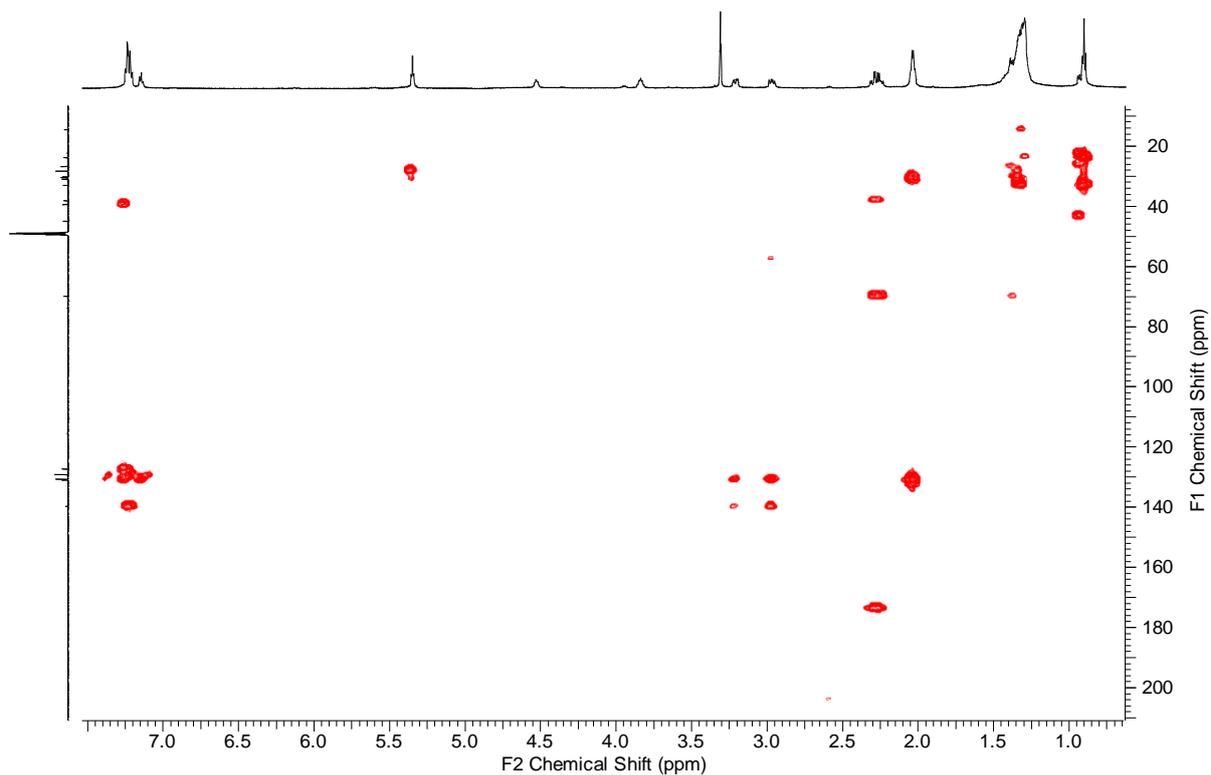


Figure S11. HMBC NMR spectrum of **2** recorded at 500MHz in CD₃OD.

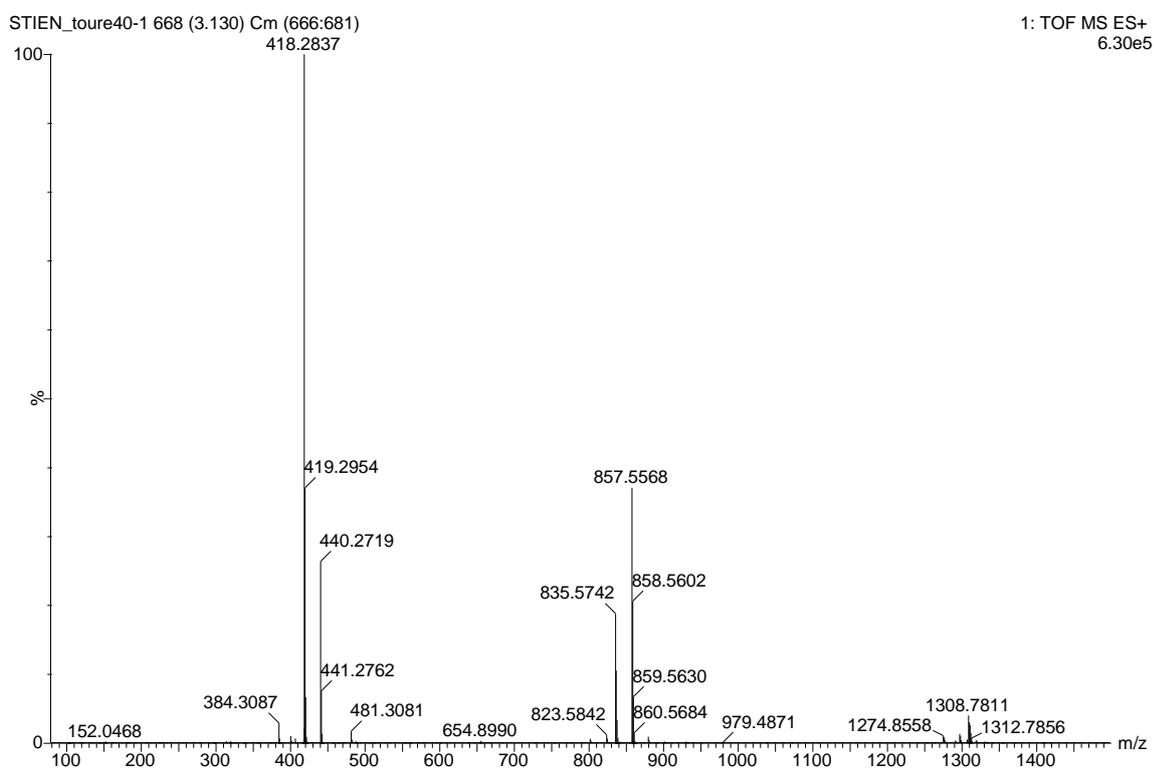


Figure S12. HRMS of compound **2** in MeOH.

Table S3. Full NMR spectroscopic data for compound **3** in CD₃OD

Position	δ_c^a , type	δ_H^b , m (J in Hz)	COSY	HMBC
1	176.5, C			
2	56.02, CH	4.62, dd (8.0, 4.7)	H3a, H3b	C1, C3, C4, C1'
3	39.0, CH ₂	2.94, dd (13.7, 8.7) 3.22, dd (13.9, 4.7)	H2 H2	C1, C2, C4, C5 C1, C2, C4, C5
4	139.2, C			
5	130.5, CH	7.23, m		C3, C4, C7
6	129.4, CH	7.24, m		C4, C7
7	127.6, CH	7.17, m		C5
1'	175.8, C			
2'	37.2, CH ₂	2.13, t (7.4) 2.23, t (7.5)	H3'	C1', C3', C4' C1', C3', C4'
3'	27.1, CH ₂	1.48, m	H2'a, H4'	C1', C2', C4'
4'	30.3, CH ₂	1.29, br s	H3'	
5'	30.3, CH ₂	1.29, br s		
6'	30.3, CH ₂	1.29, br s		
7'	30.3, CH ₂	1.29, br s		
8'	30.3, CH ₂	2.03, m	H9'	C7', C9'
9'	131.0, CH	5.35, m	H8'	C7', C8'
10'	131.0, CH	5.35, m	H11'	C11', C12'
11'	30.3, CH ₂	2.03, m	H10', H12'	C10'
12'	30.5, CH ₂	1.33, br s	H11'	
13'	30.5, CH ₂	1.33, br s		
14'	30.5, CH ₂	1.33, br s		
15'	23.8, CH ₂	1.31, br s	H16'	
16'	14.6, CH ₃	0.90, t (6.8)	H15'	C15', C14'

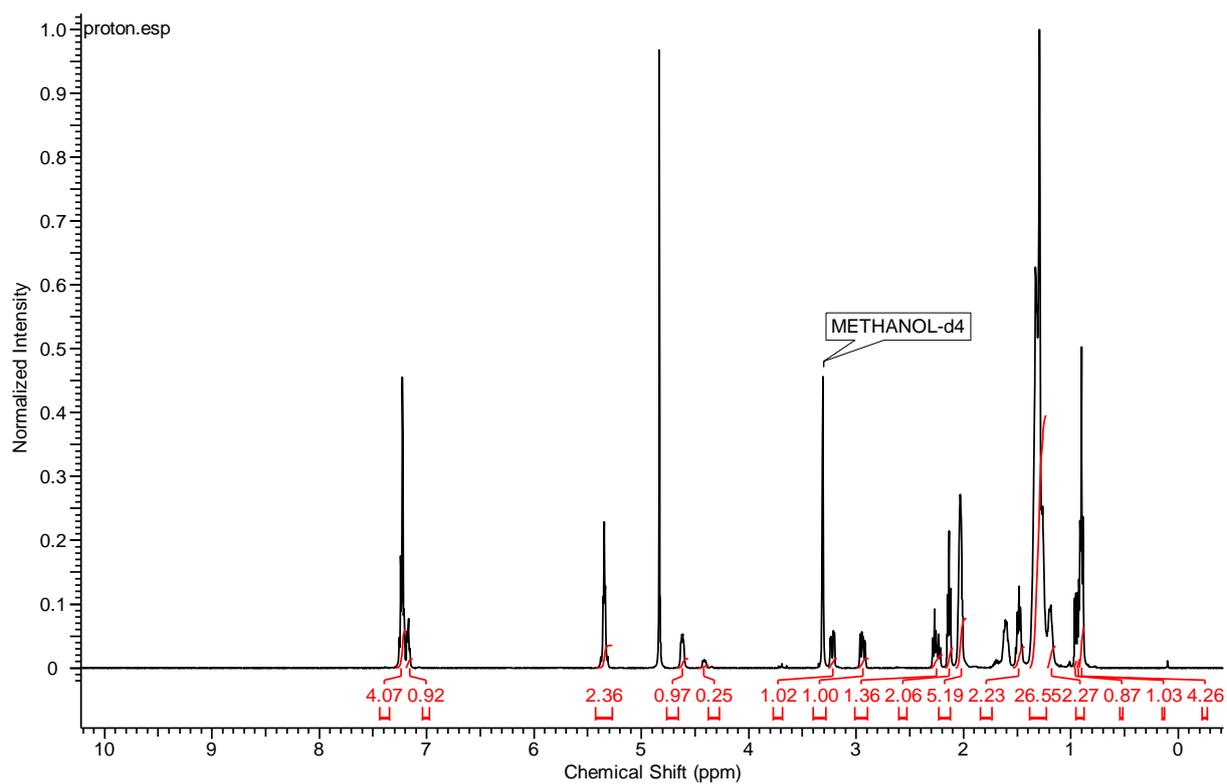


Figure S13. ^1H NMR spectrum of **3** recorded at 500MHz in CD_3OD .

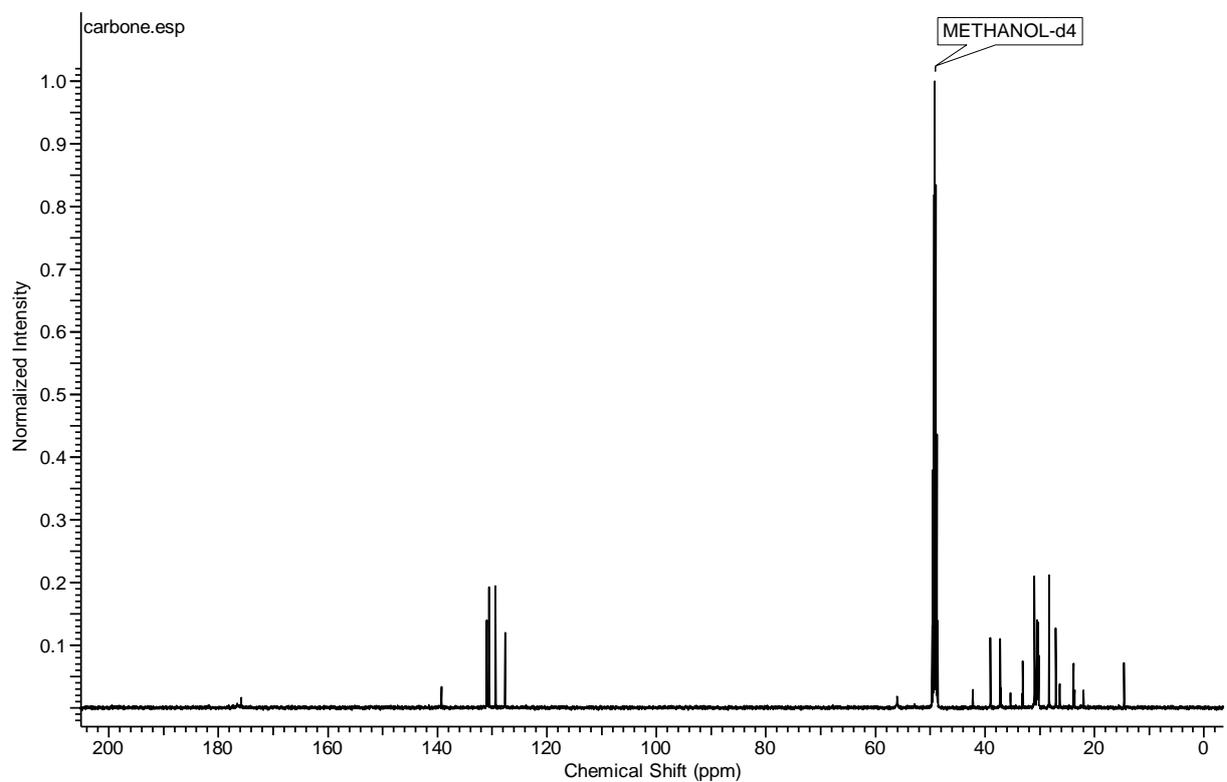


Figure S14. ^{13}C NMR spectrum of **3** recorded at 125MHz in CD_3OD .

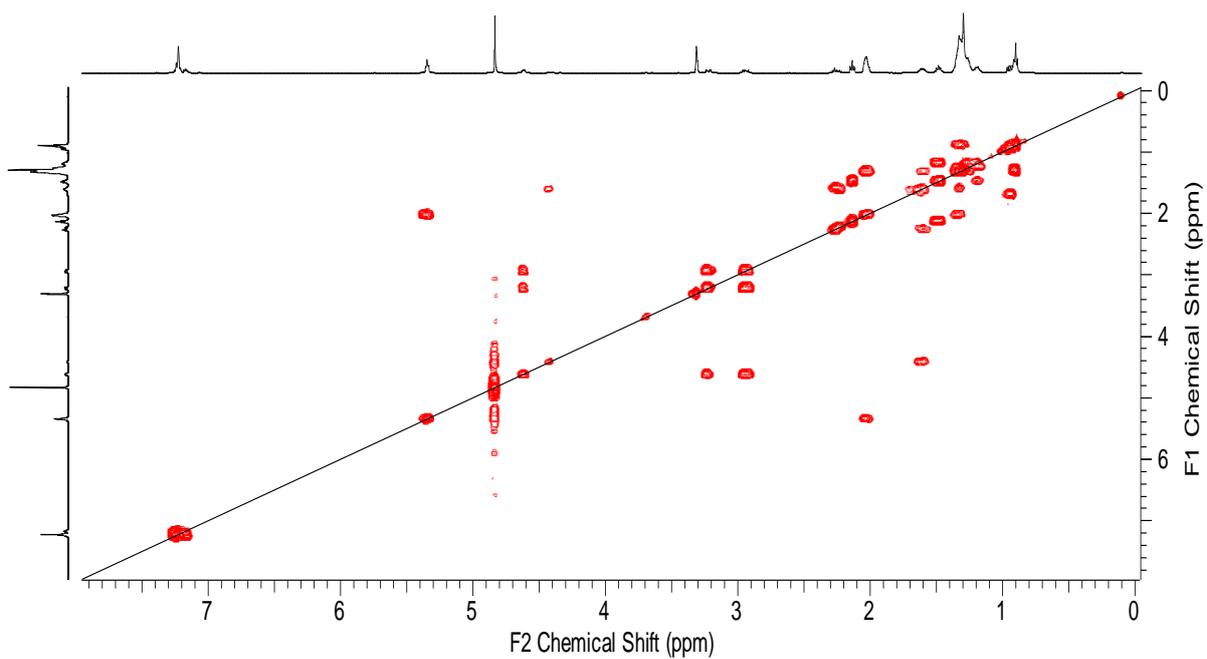


Figure S15. COSY NMR spectrum of **3** recorded at 500MHz in CD3OD.

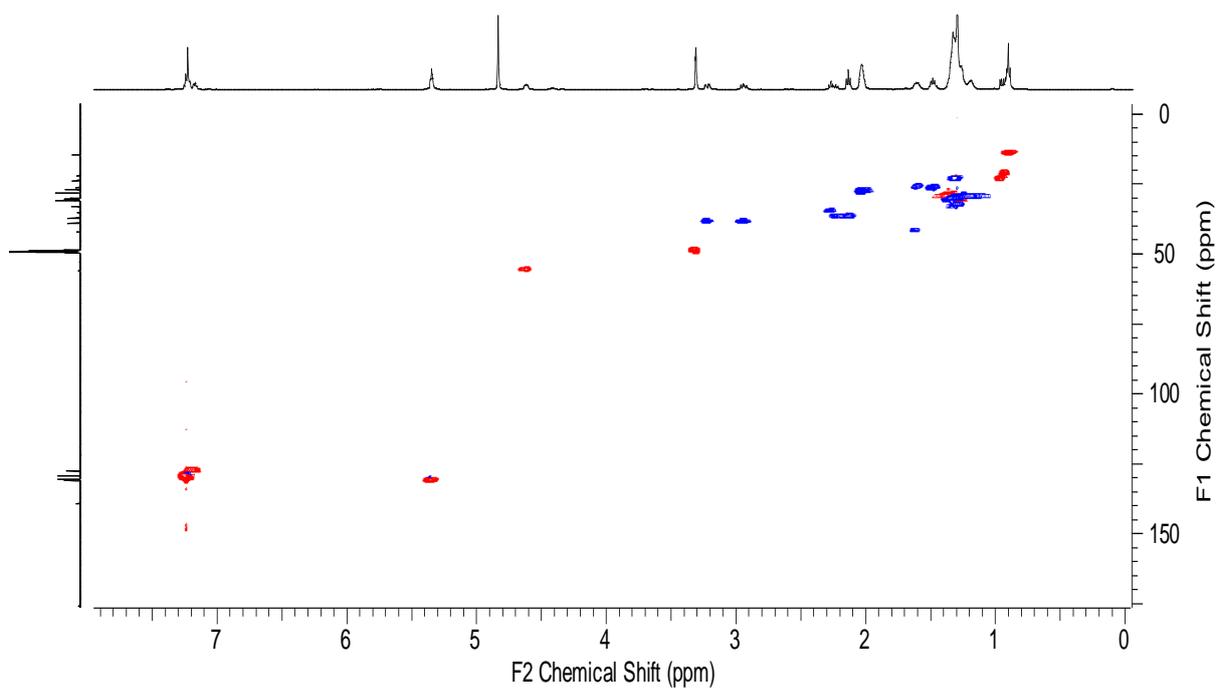


Figure S16. HSQC spectrum of **3** recorded at 500MHz in CD3OD.

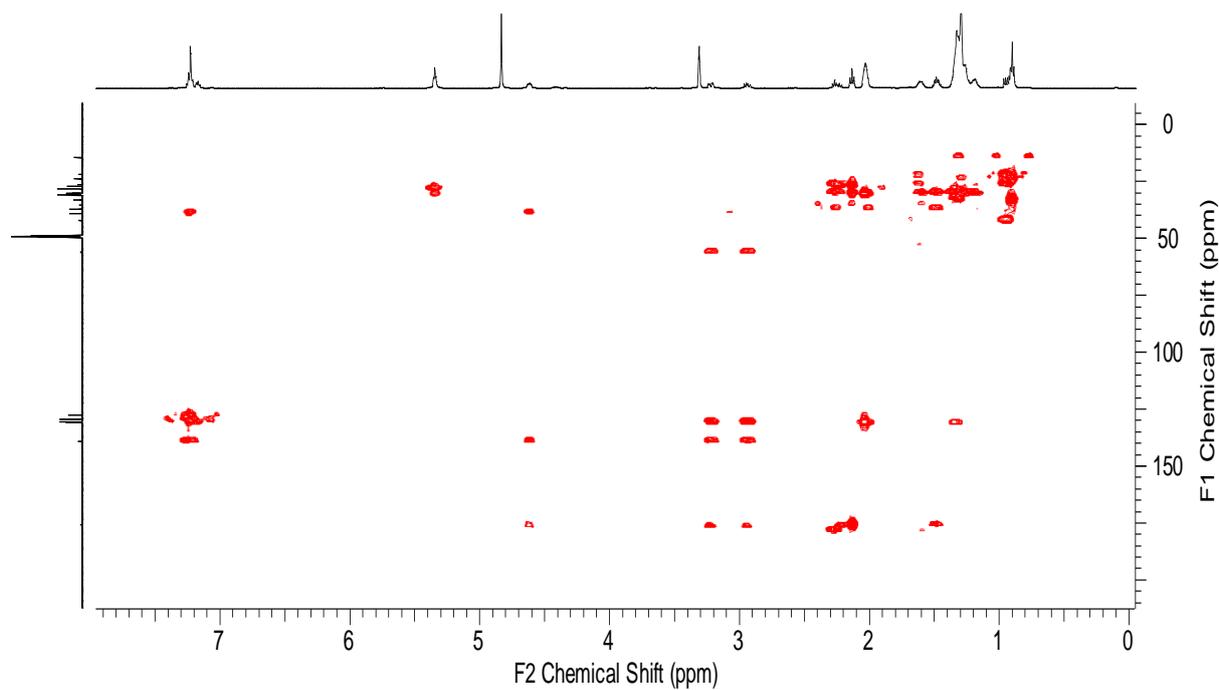


Figure S17. HMBC spectrum of **3** recorded at 500MHz in CD₃OD.

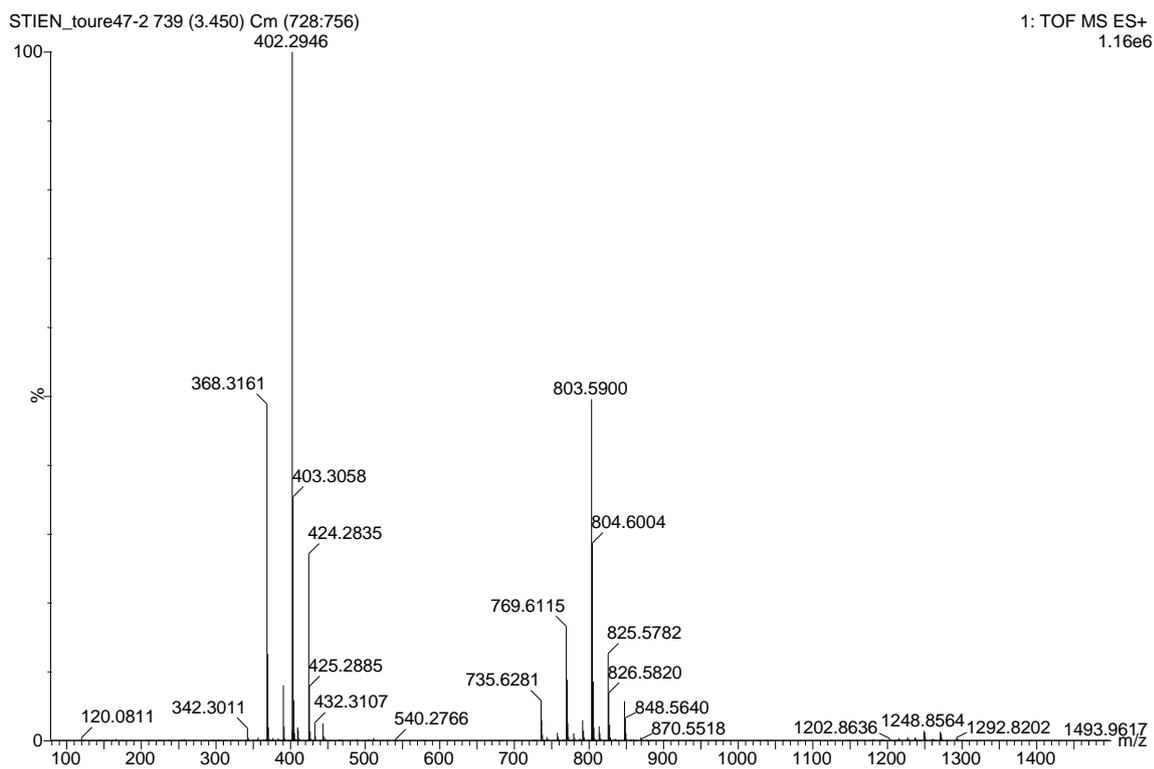


Figure S18. HRMS of compound **3** recorded in MeOH.

Spectroscopic data of compound **4**

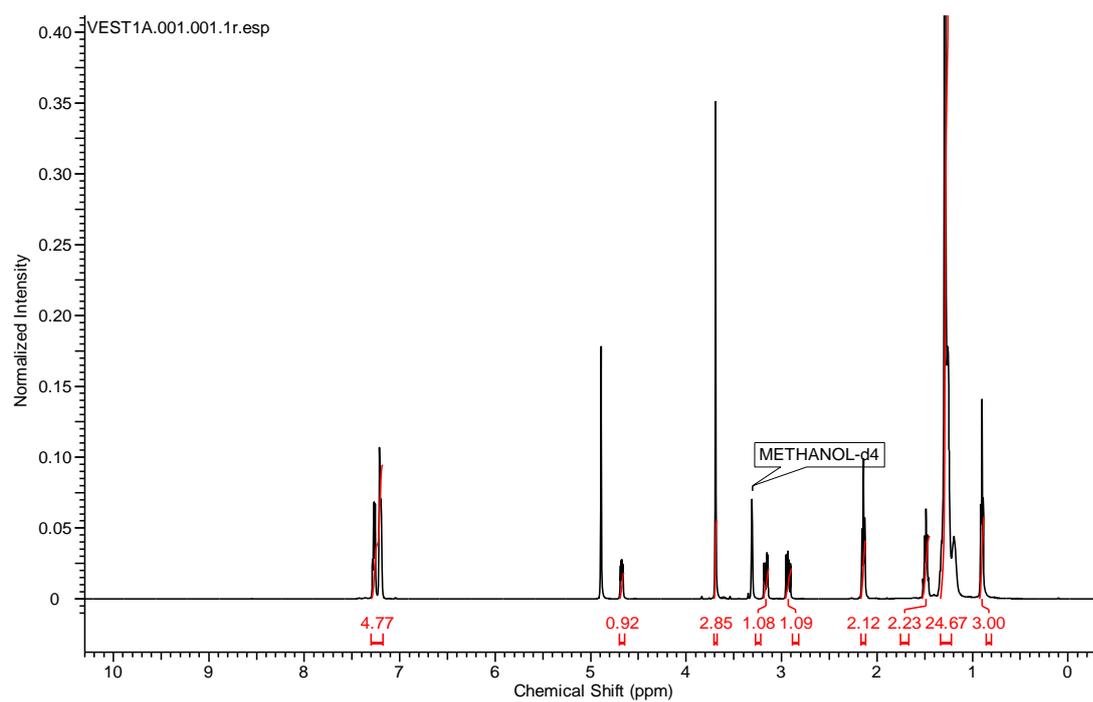


Figure S19. ^1H spectrum of **4** recorded at 500MHz in CD_3OD .

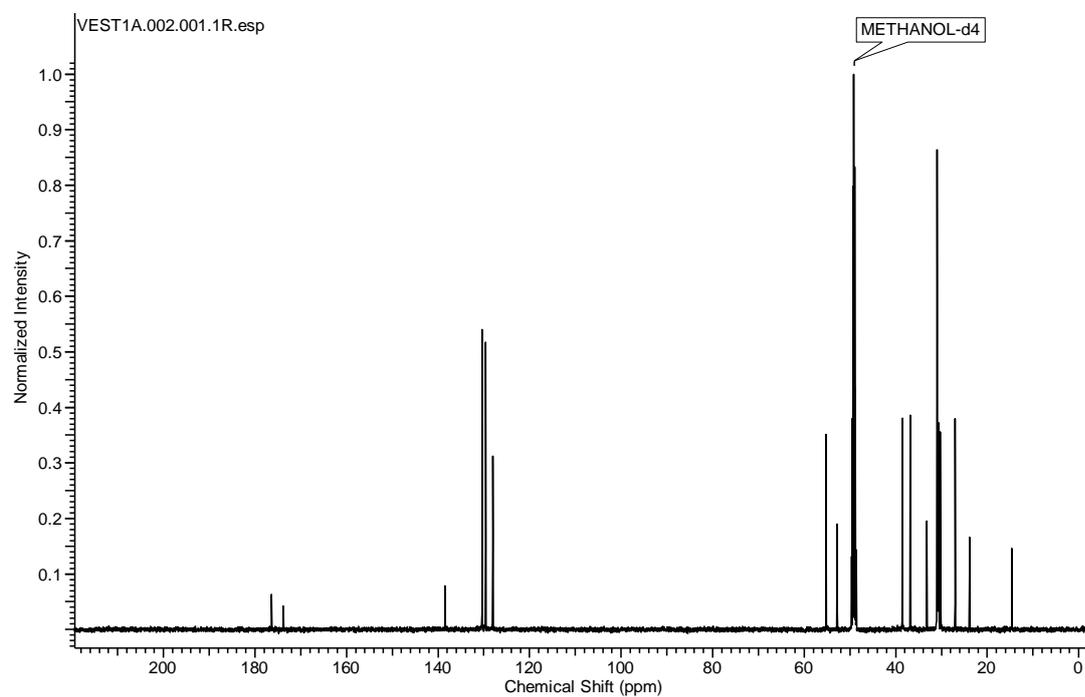


Figure S20. ^{13}C spectrum of **4** recorded at 125MHz in CD_3OD .

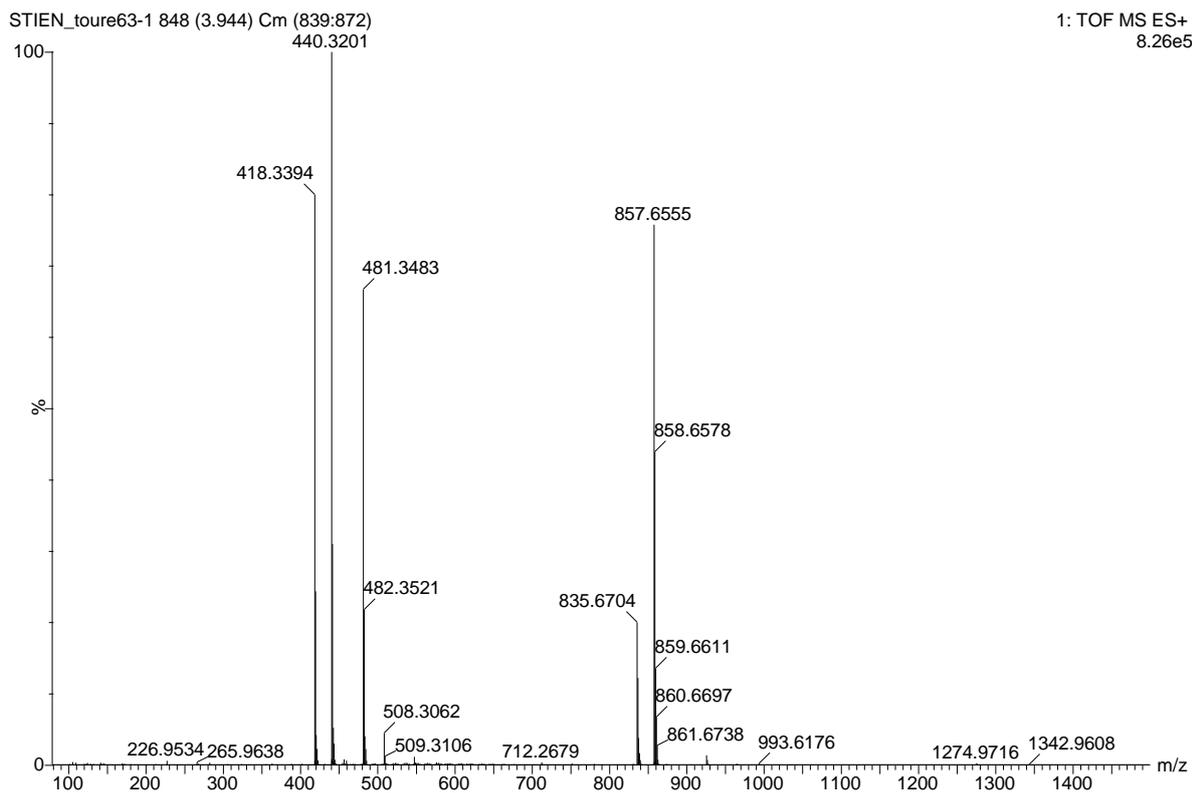


Figure S21. HRMS of compound **4** recorded in MeOH.

Spectroscopic data of compound **5**

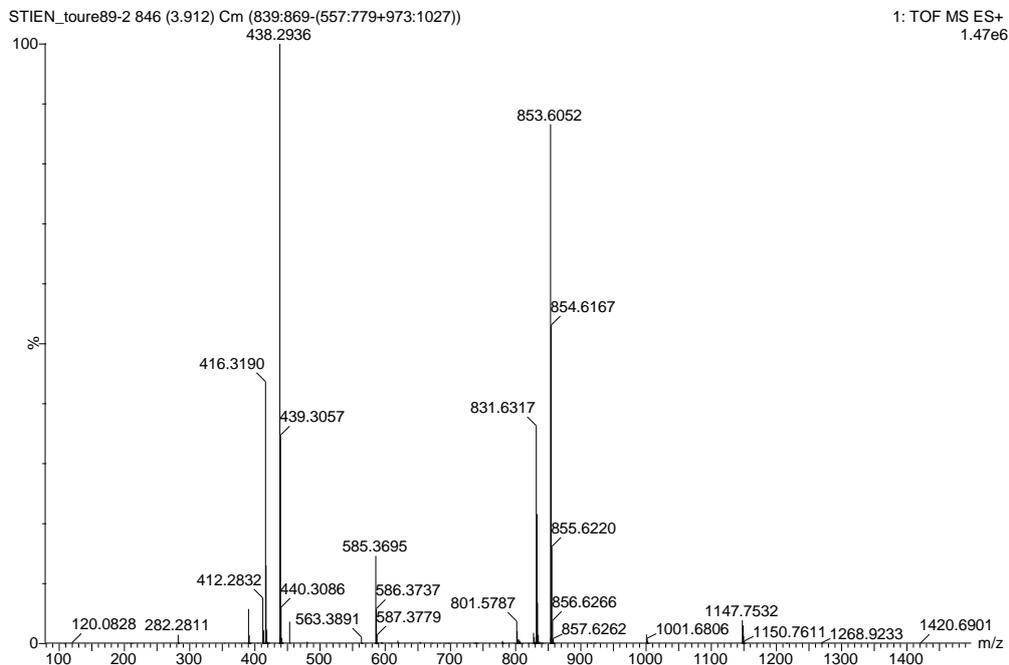


Figure S24. HRMS of compound **5** recorded in MeOH.

Spectroscopic data of compound 6

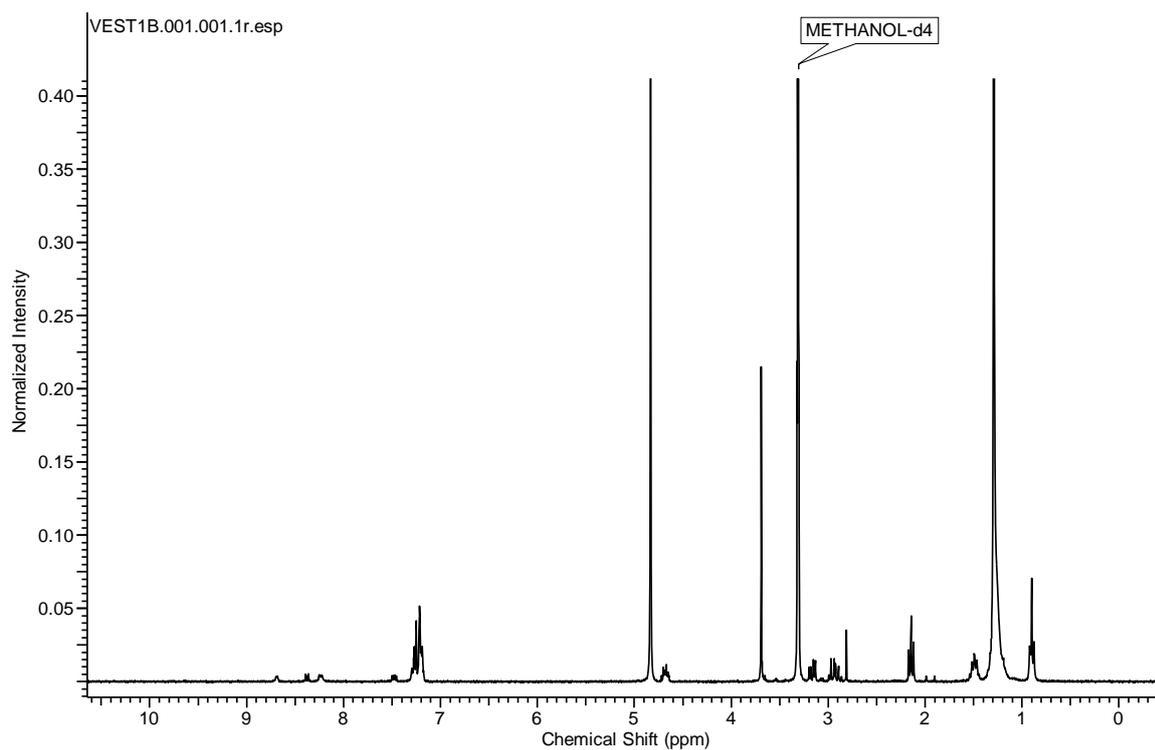


Figure S25. ^1H spectrum of **6** recorded at 500MHz in CD_3OD .

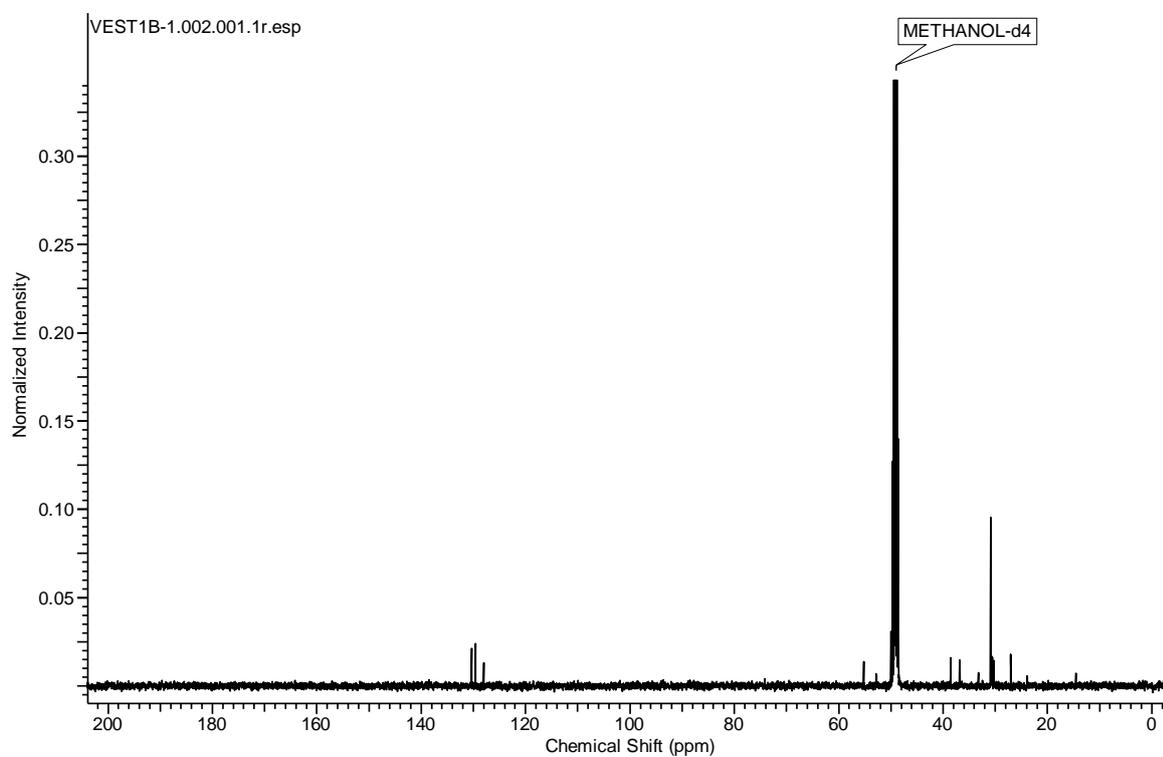


Figure S26. ^{13}C NMR spectrum for compound **6** in CD_3OD

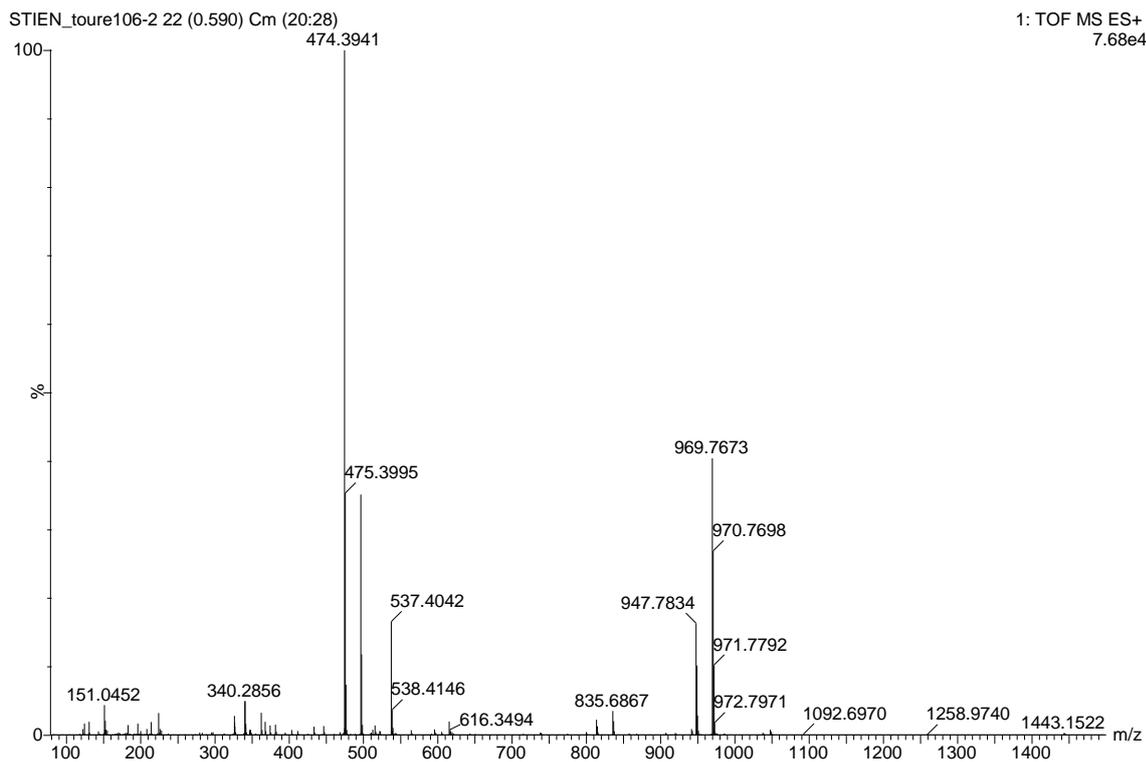


Figure S27. HRMS of compound **6** recorded in MeOH.

Spectroscopic data of compound **7**

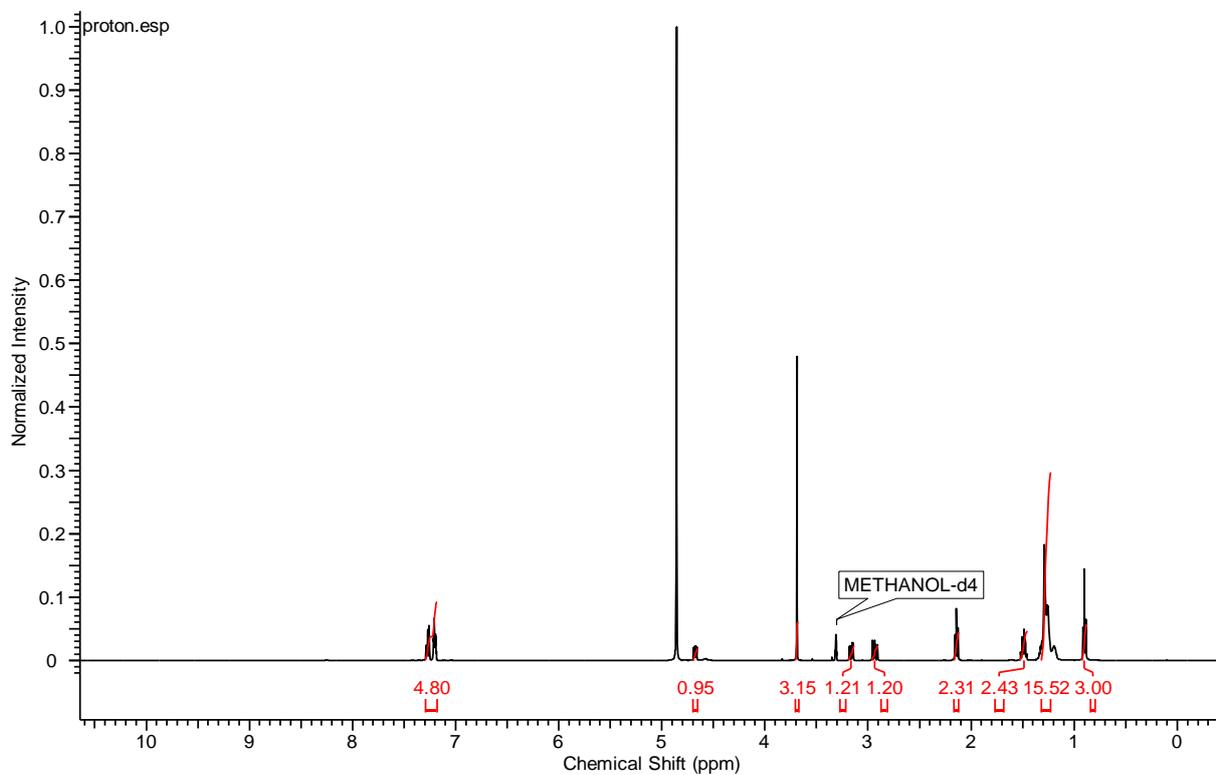


Figure S28. ^1H NMR spectrum for compound **7** in CD_3OD

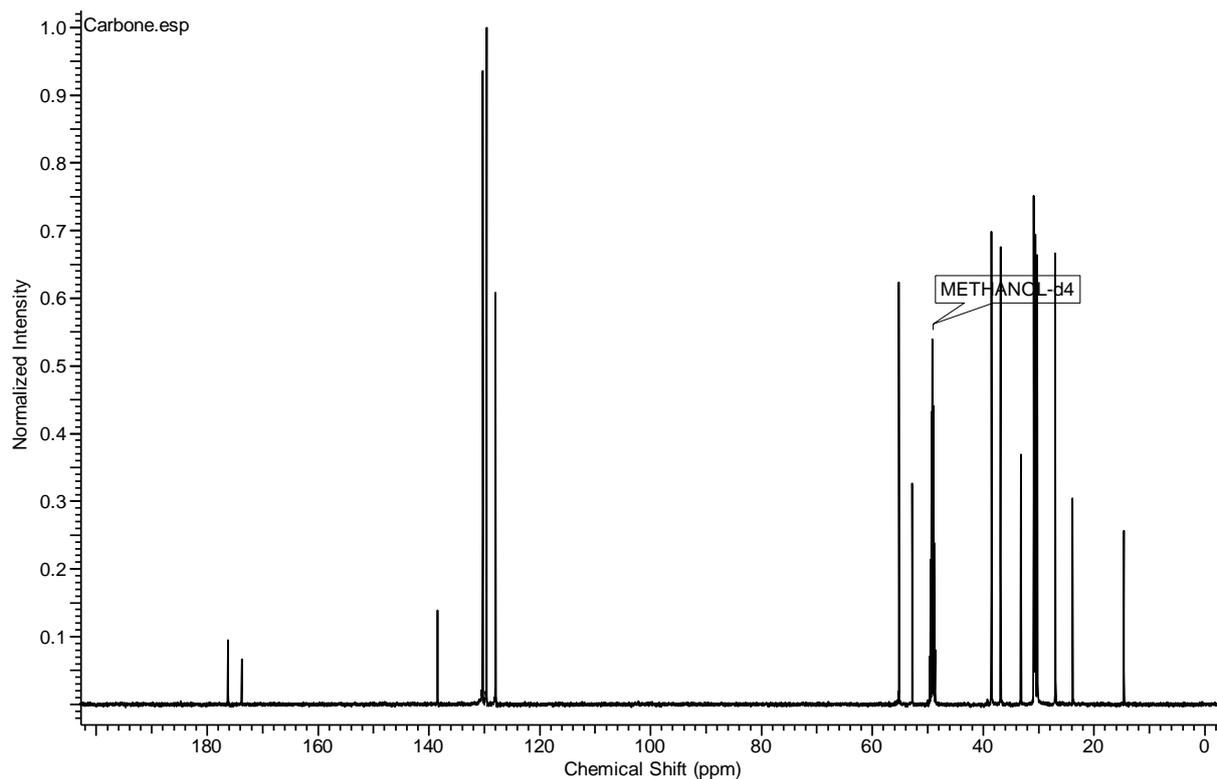


Figure S29. ^{13}C NMR spectrum for compound **7** in CD_3OD

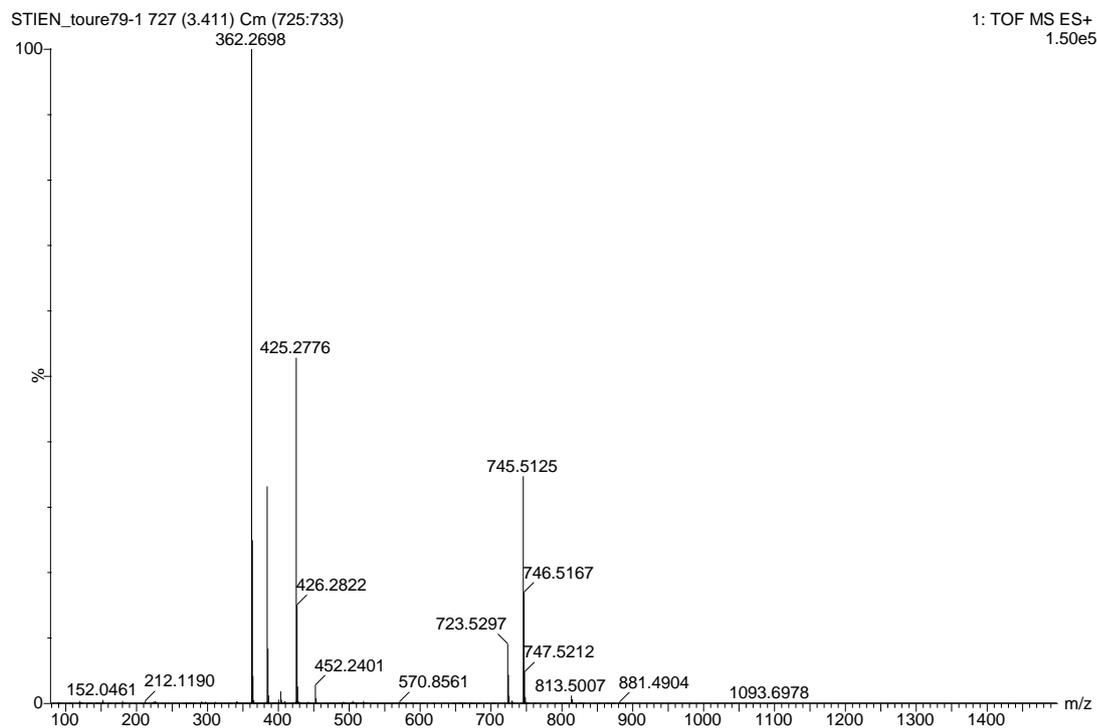


Figure S30. HRMS of compound **7** in MeOH

Spectroscopic data of compound **8**

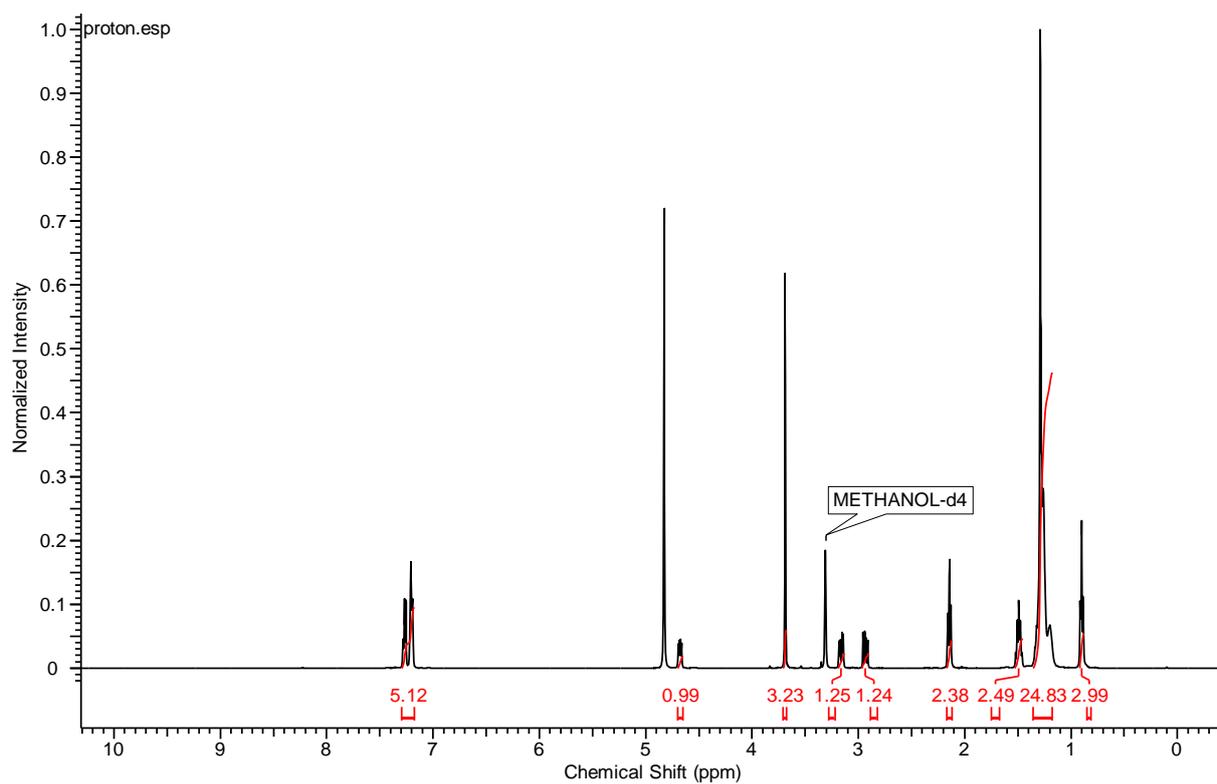


Figure S31. ^1H NMR spectrum for compound **8** in CD_3OD

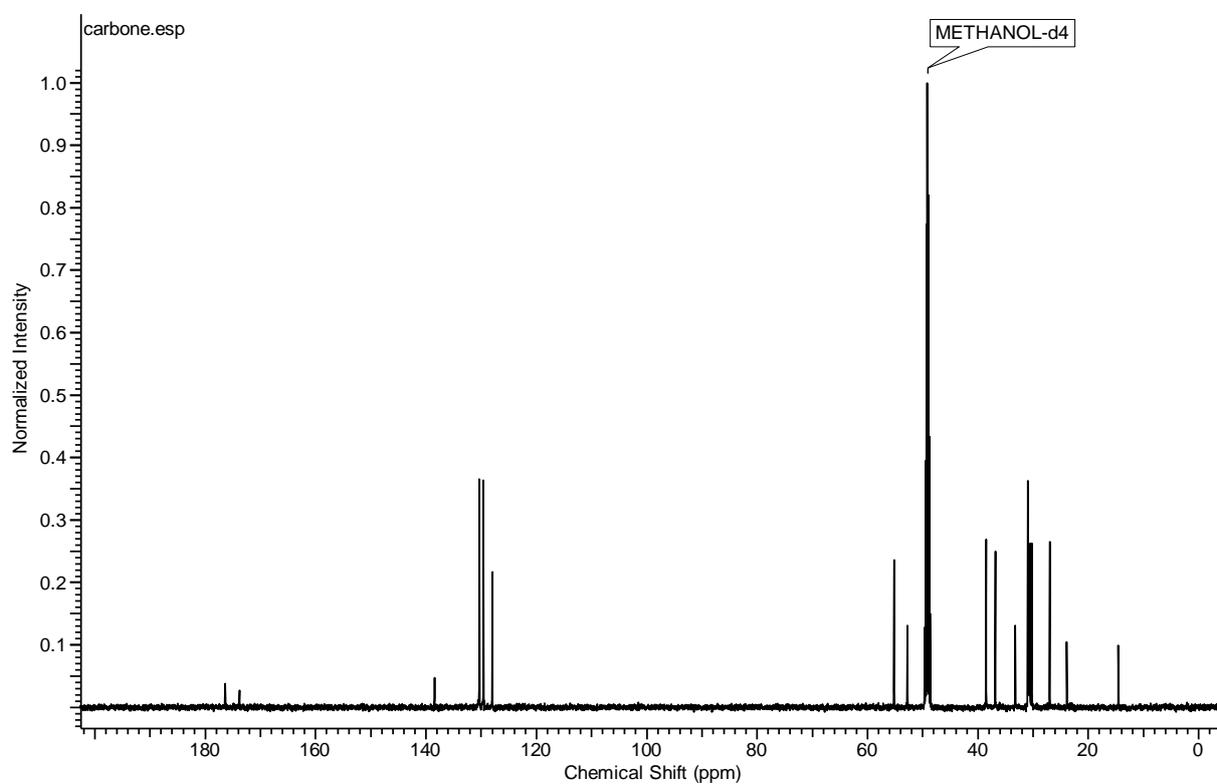


Figure S32. ^{13}C NMR spectrum for compound **8** in CD_3OD

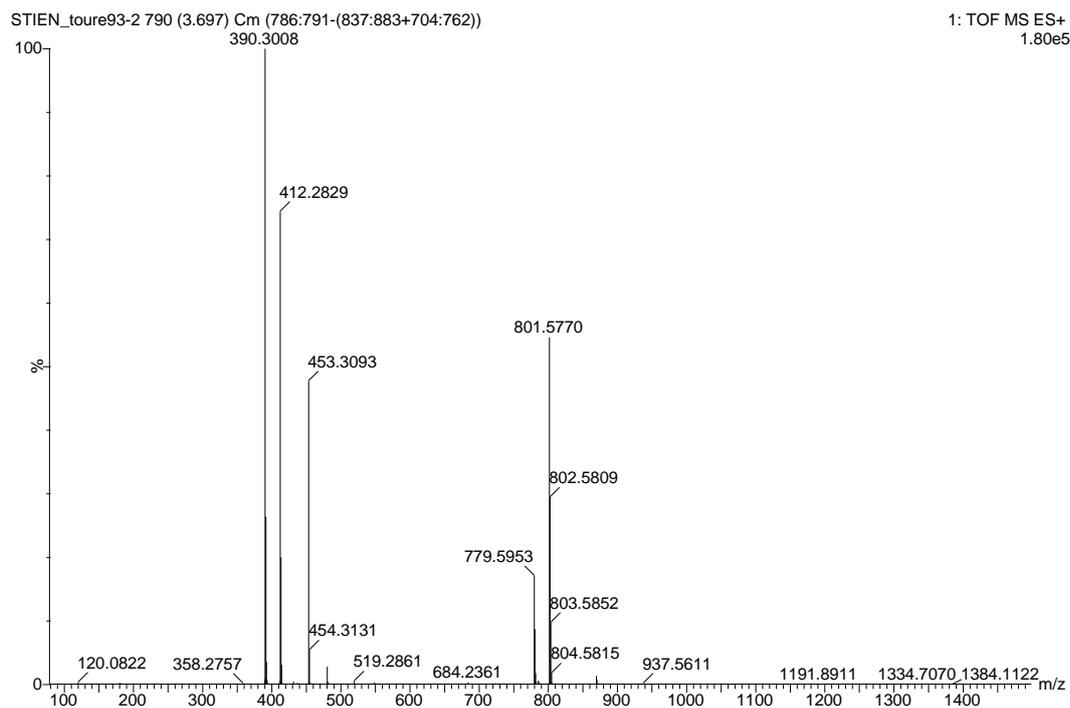


Figure S33. HRMS of compound **8** in MeOH

Spectroscopic data of compound **9**

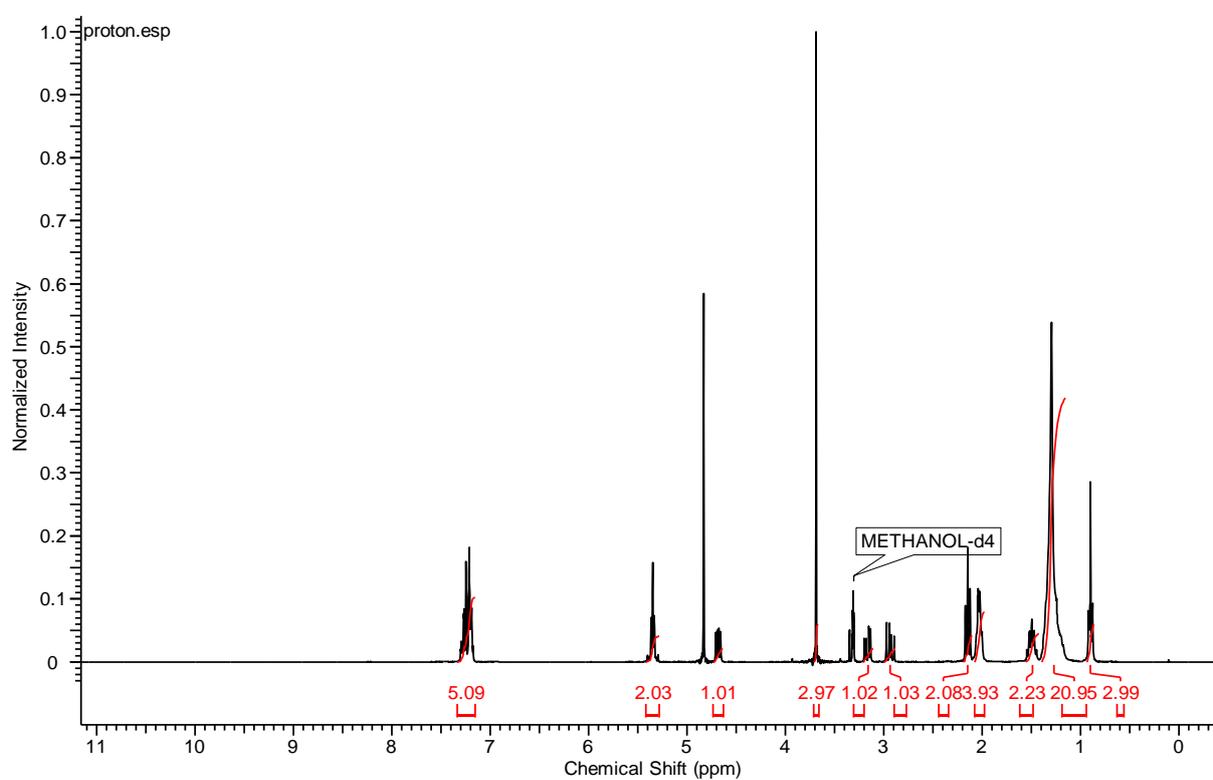


Figure S34. ^1H NMR spectrum for compound **9** in CD_3OD

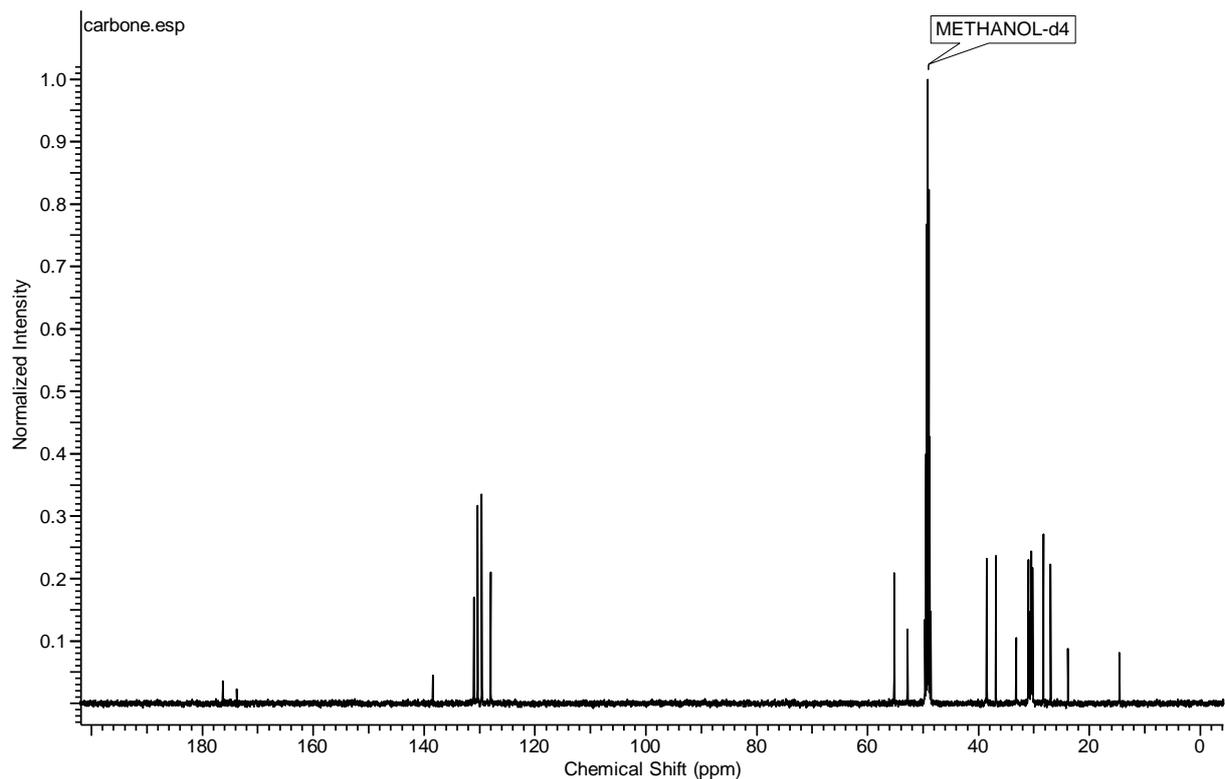


Figure S35. ^{13}C NMR spectrum for compound **9** in CD_3OD

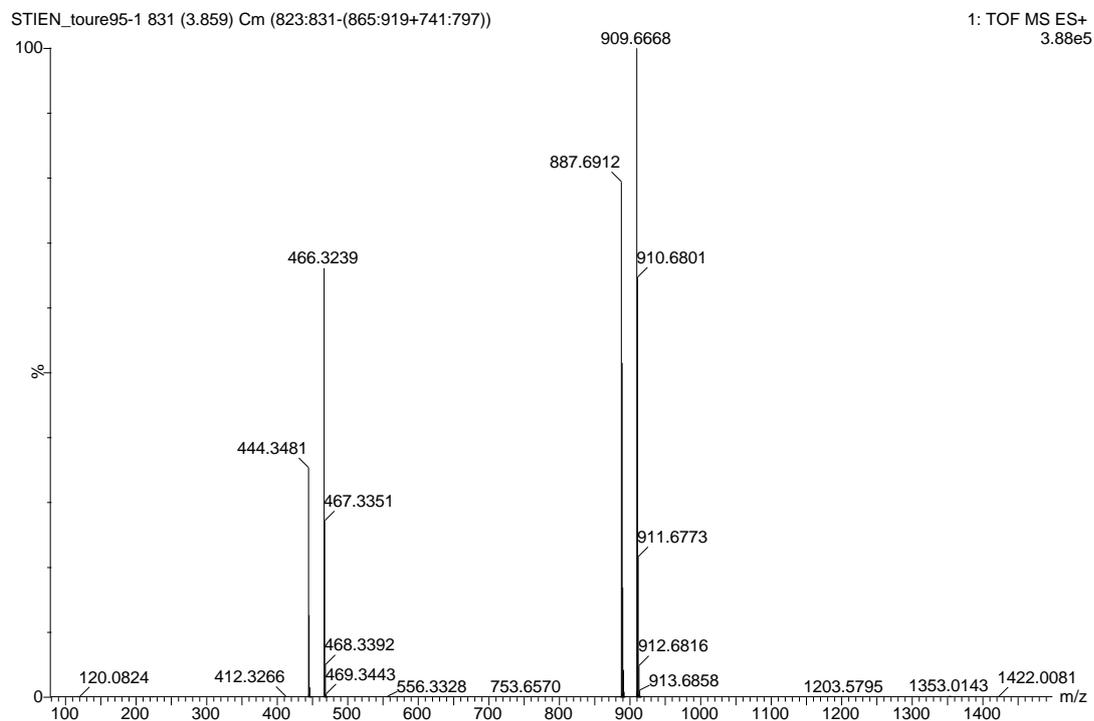


Figure S36. HRMS of compound **9** in MeOH

Spectroscopic data of compound **10**

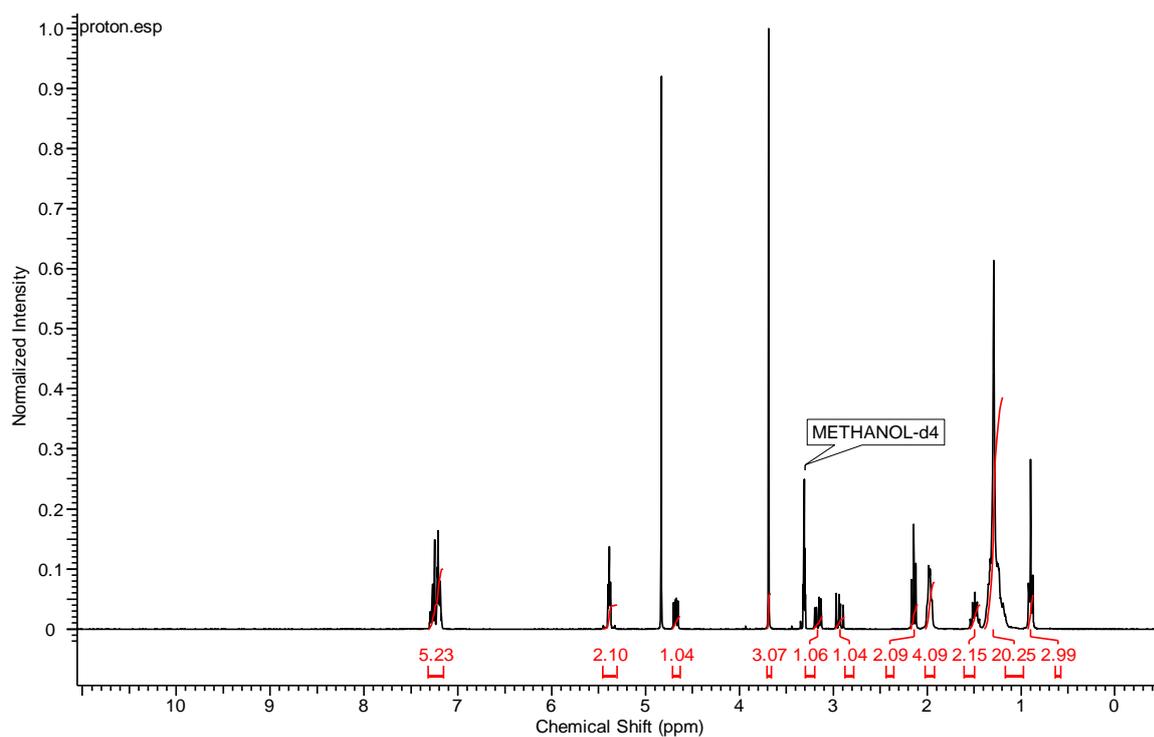


Figure S37. ^1H NMR spectrum for compound **10** in CD_3OD

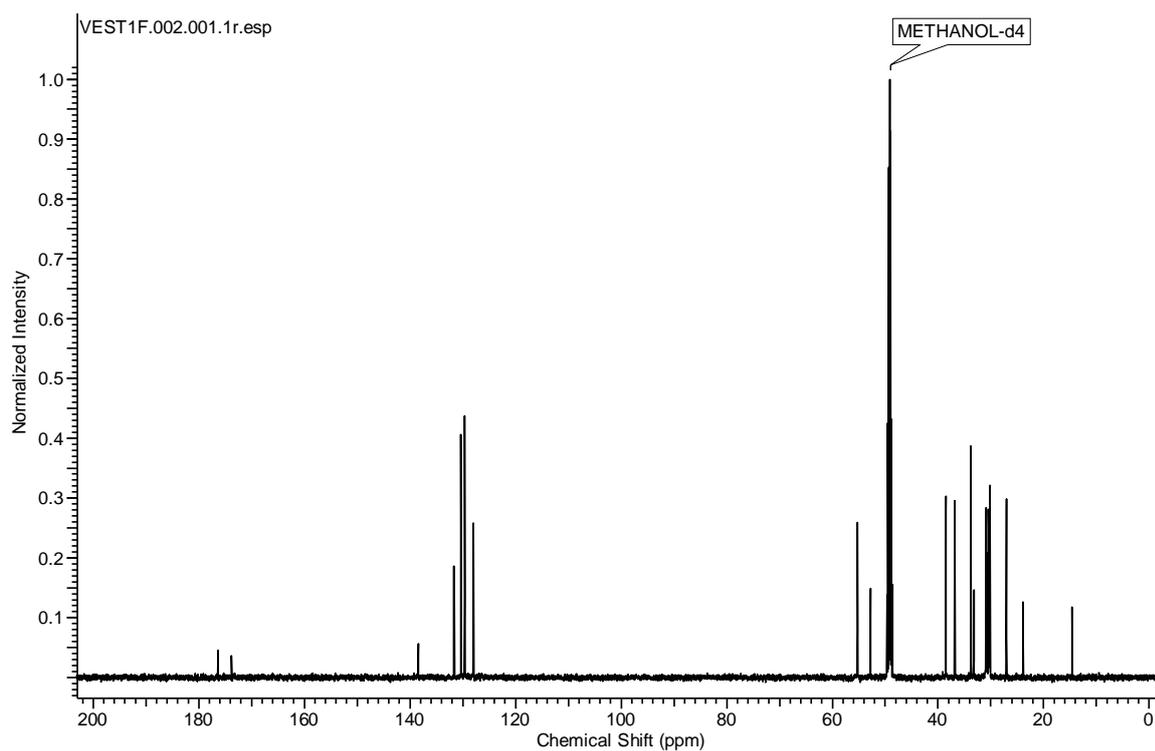


Figure S38. ^{13}C NMR spectrum for compound **10** in CD_3OD

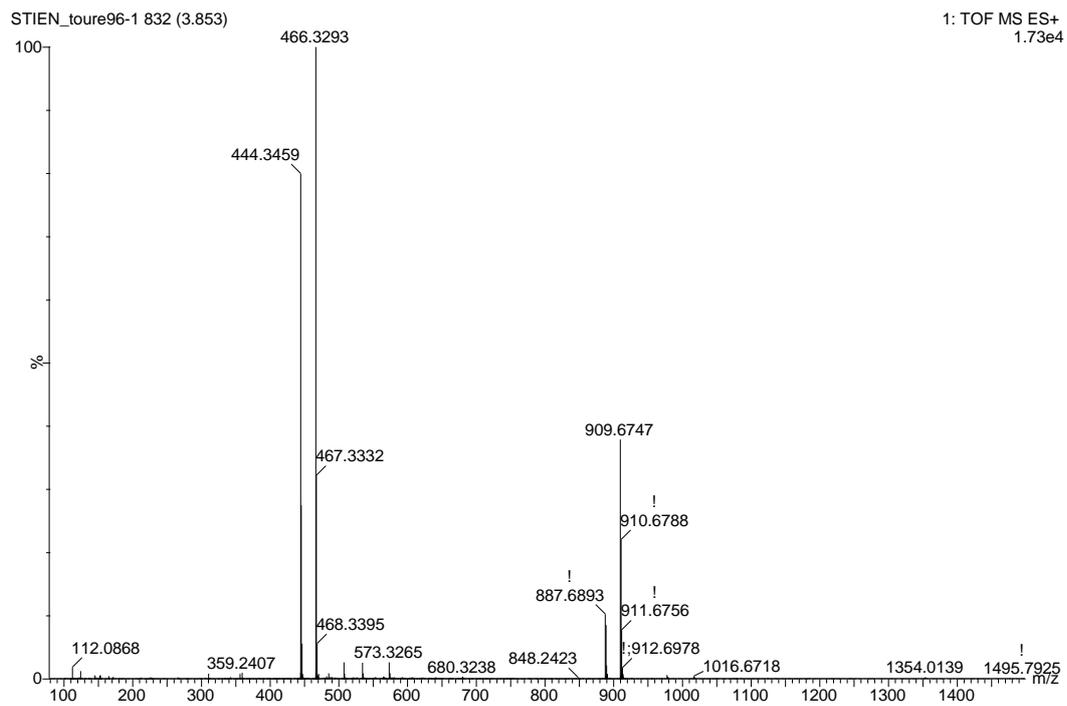


Figure S39. HRMS of compound **10** in MeOH

Spectroscopic data of compound **11**

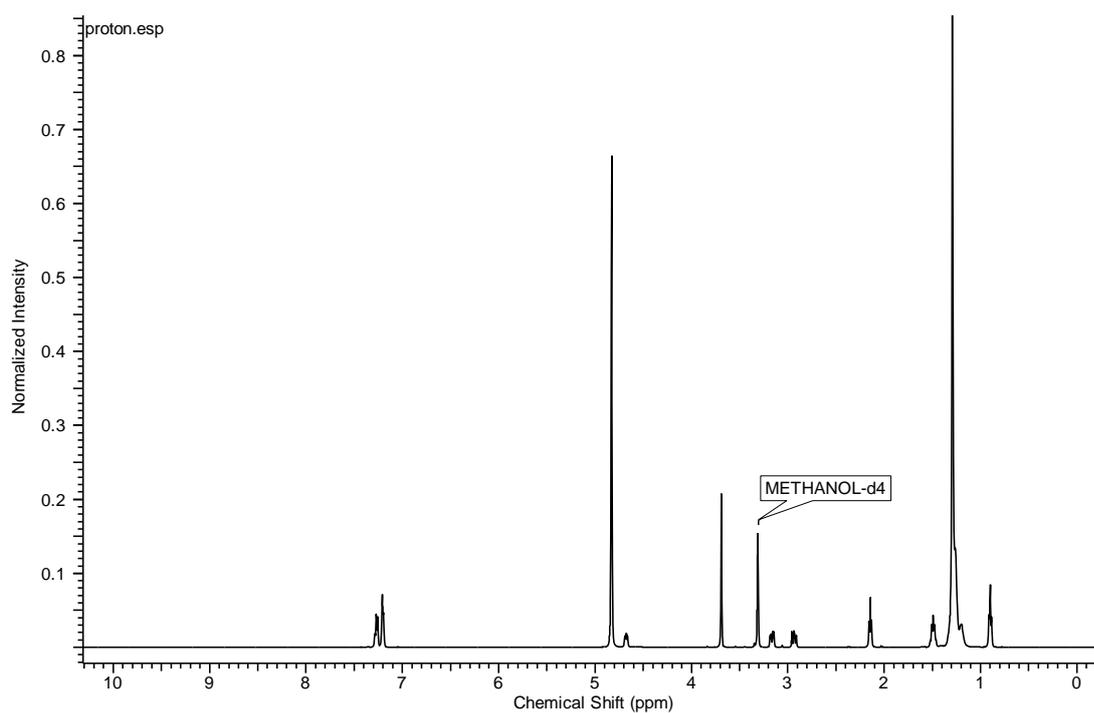


Figure S40. ^1H NMR spectrum for compound **11** in CD_3OD

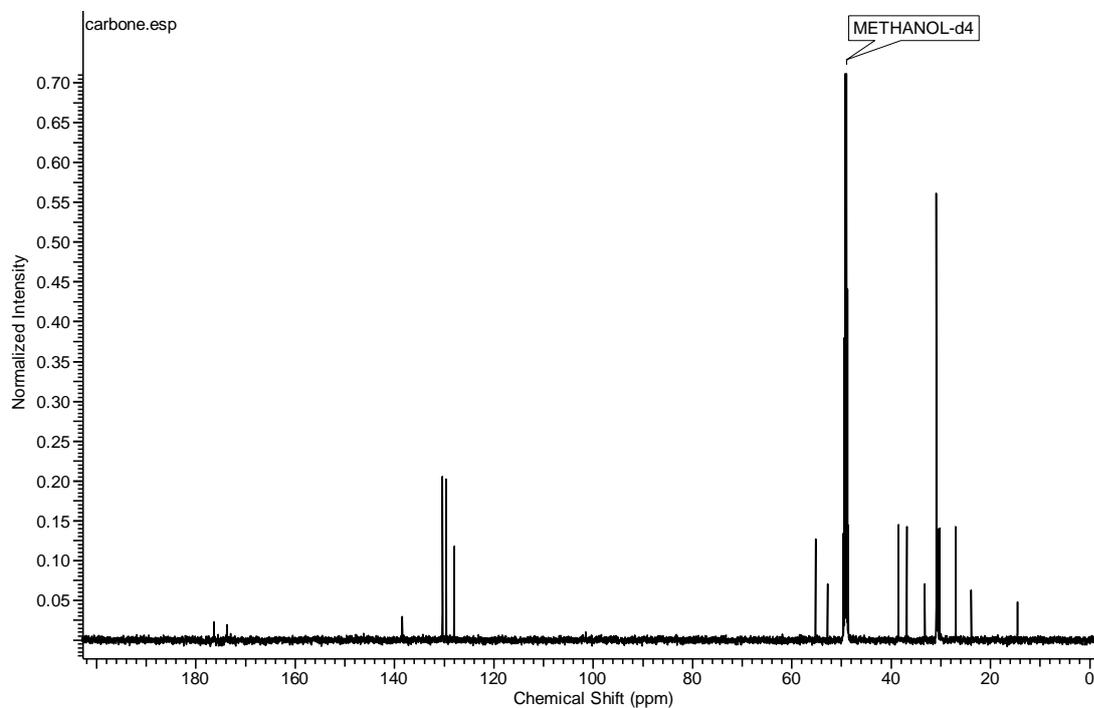


Figure S41. ^{13}C NMR spectrum for compound **11** in CD_3OD

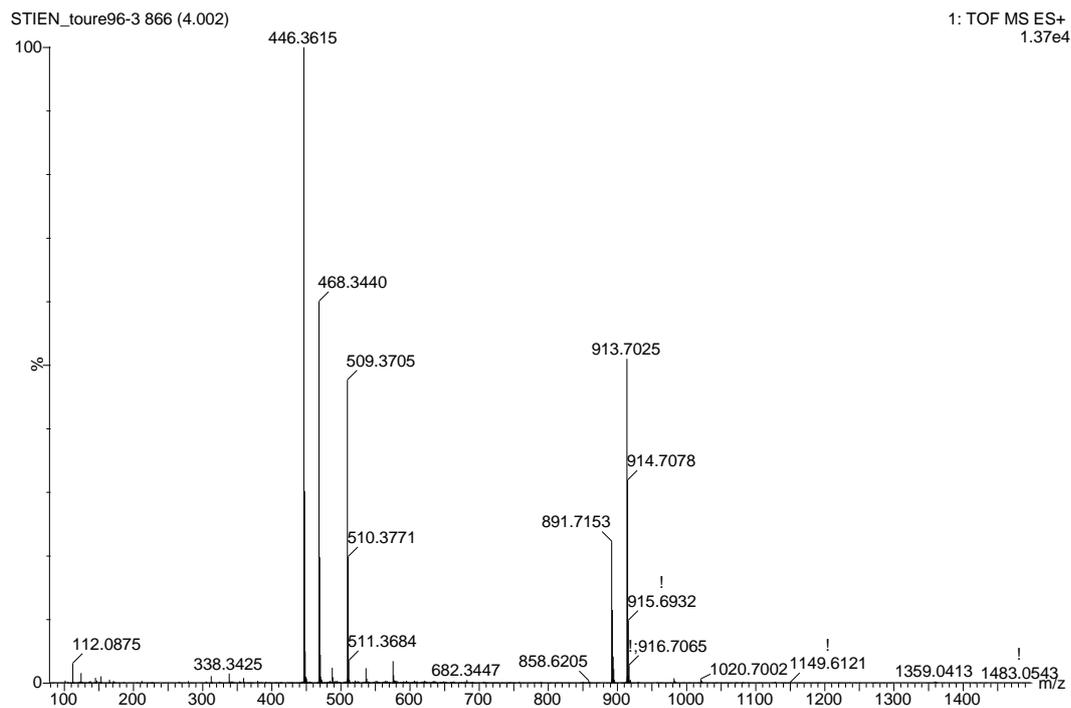


Figure S42. HRMS of compound **11** in MeOH

Spectroscopic data of compound **12**

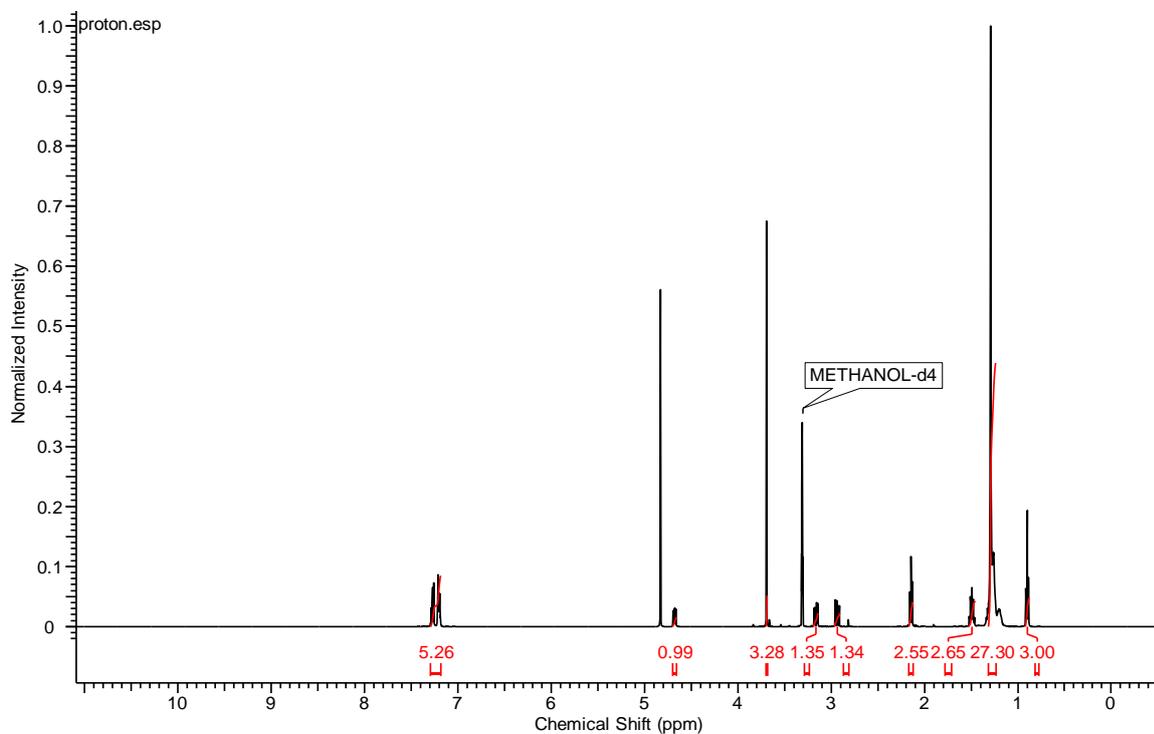


Figure S43. ^1H NMR spectrum for compound **12** in CD_3OD

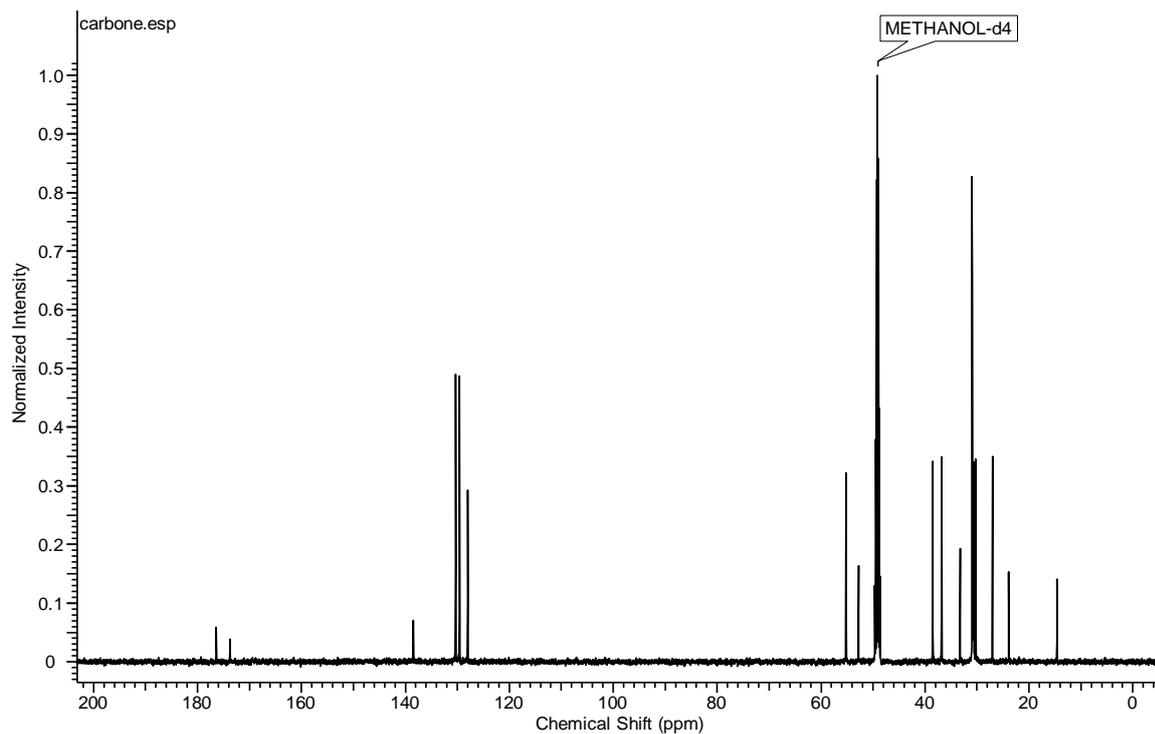


Figure S44. ^{13}C NMR spectrum for compound **12** in CD_3OD

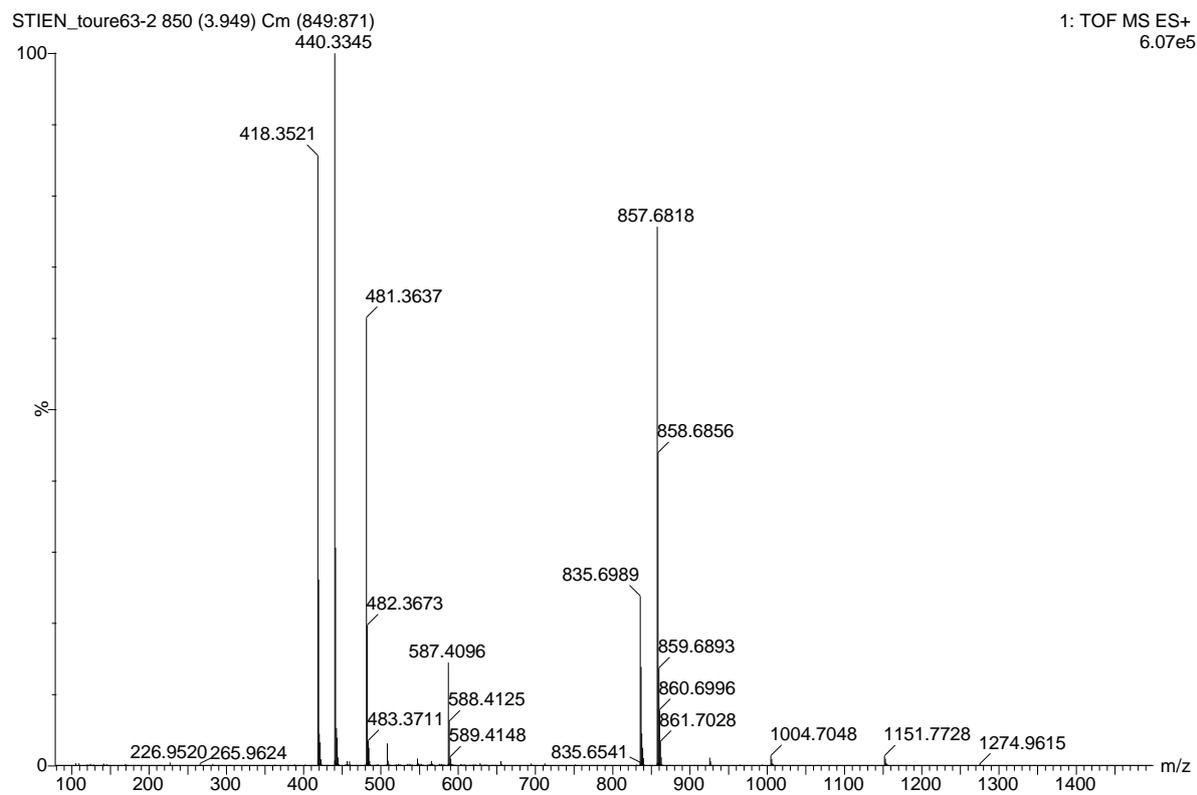


Figure S45. HRMS of compound **12** in MeOH

Spectroscopic data of compound **13**

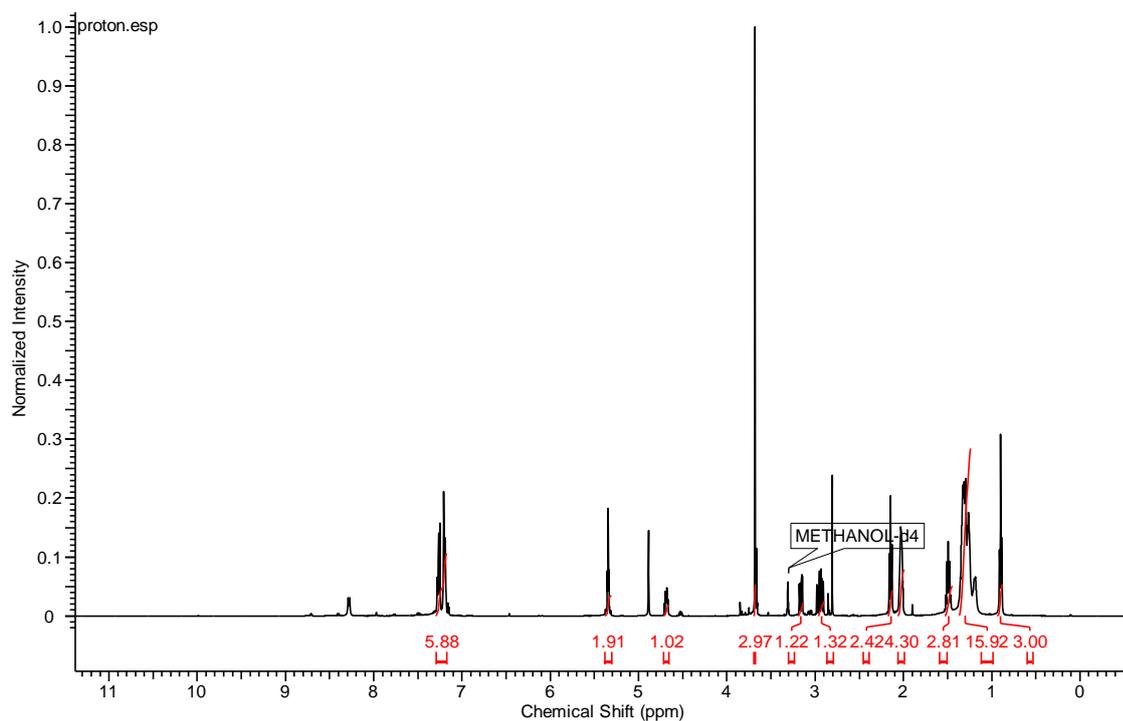


Figure S46. ^1H NMR spectrum for compound **13** in CD_3OD

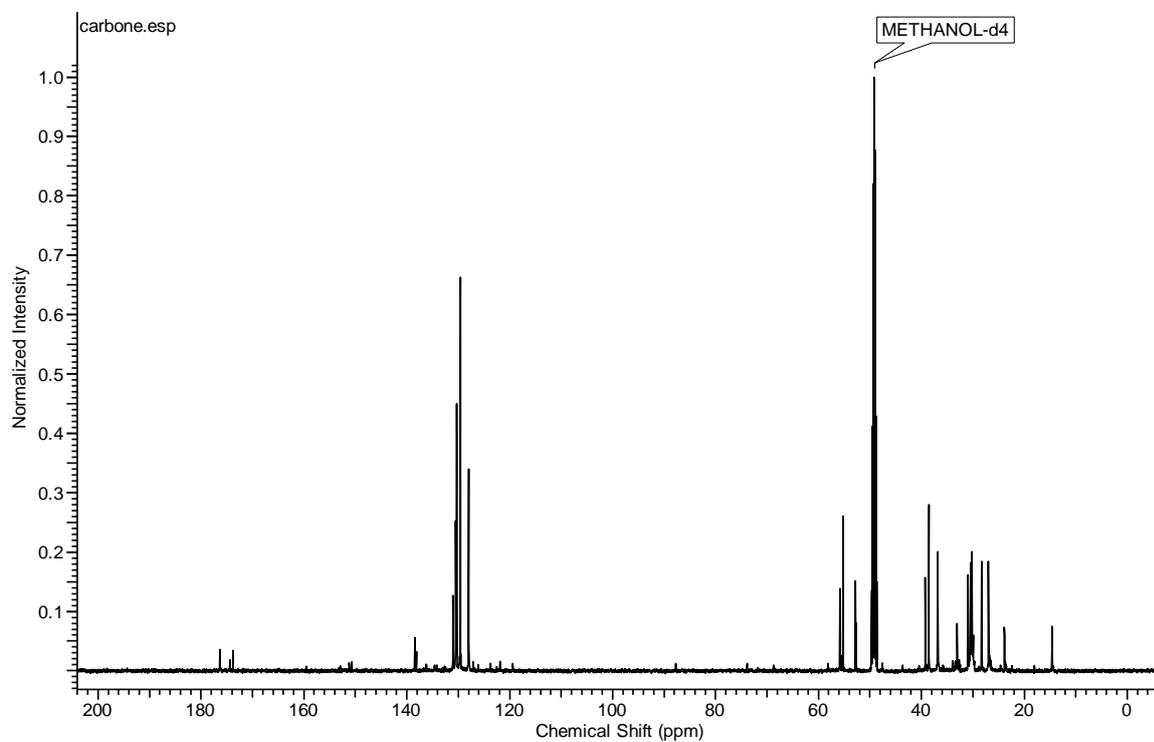


Figure S47. ^{13}C NMR spectrum for compound **13** in CD_3OD

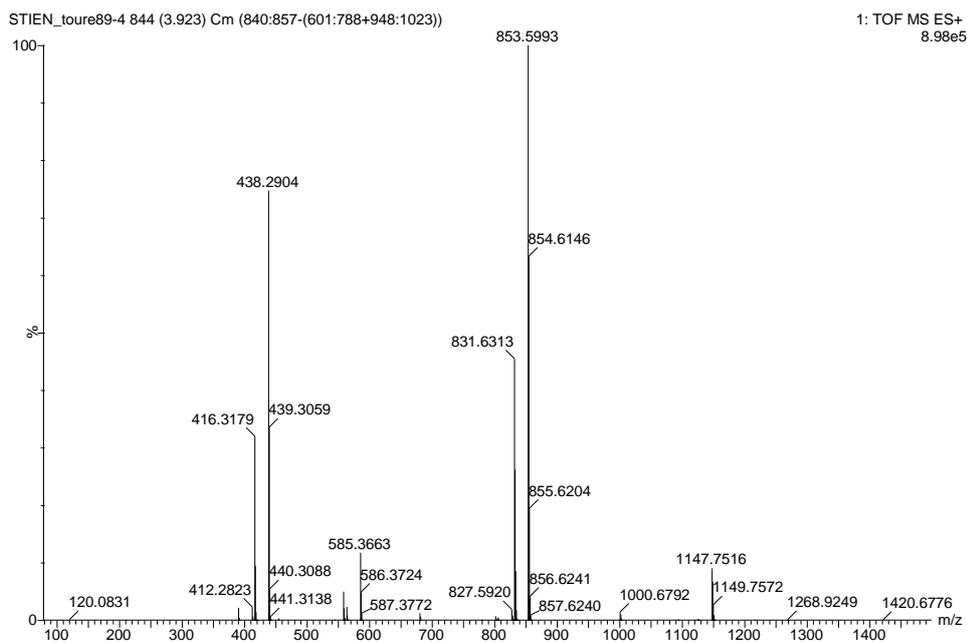


Figure S48. HRMS of compound **13** in MeOH

Spectroscopic data of compound **14**

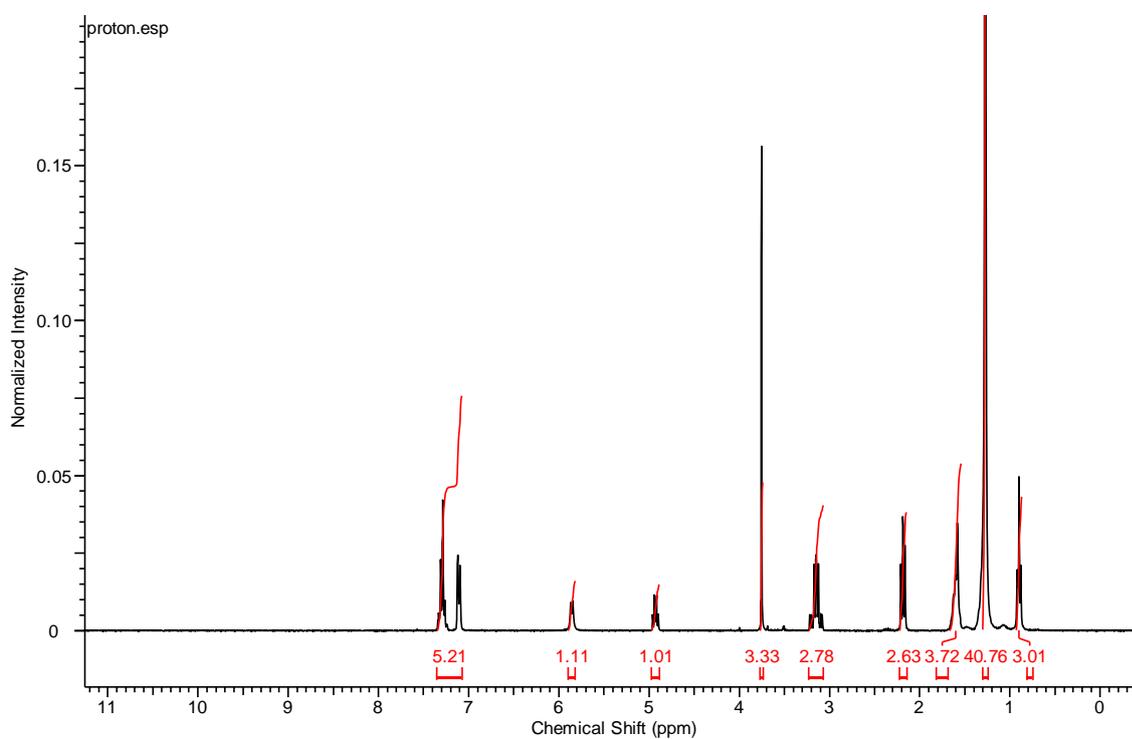


Figure S49. ^1H NMR spectrum for compound **14** in CD_3OD

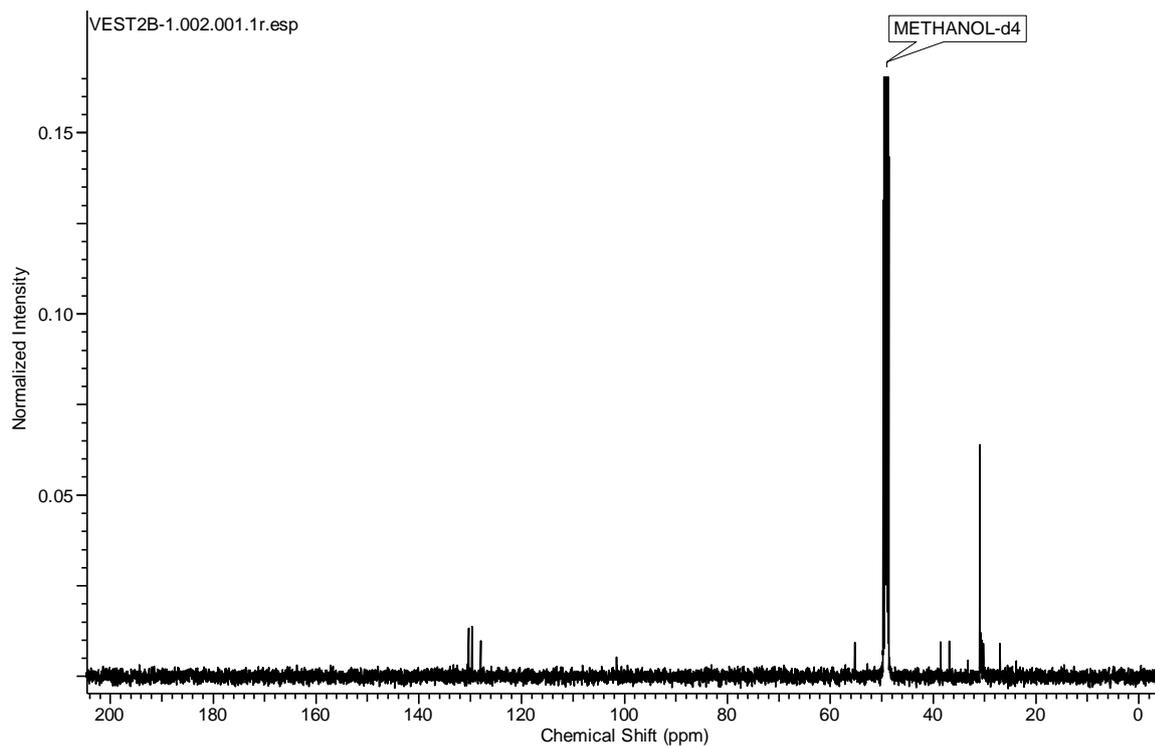


Figure S50. ^{13}C NMR spectrum for compound **14** in CD_3OD

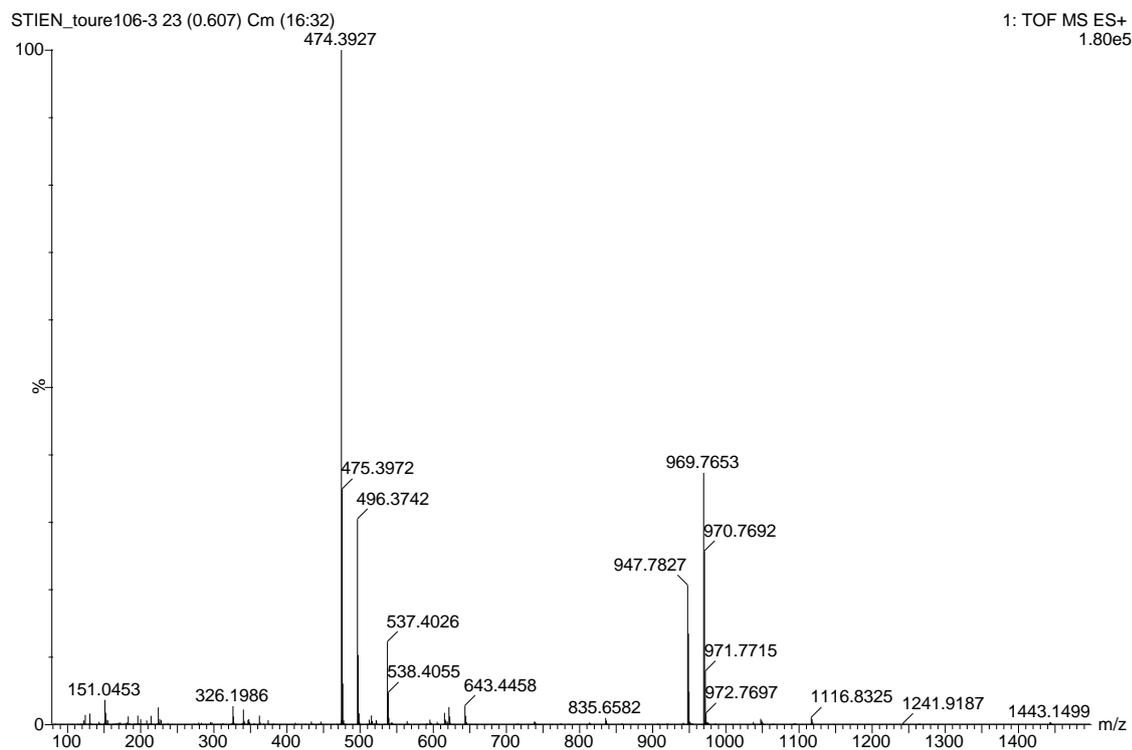


Figure S51. HRMS of compound **14** in MeOH

Spectroscopic data of compound 15

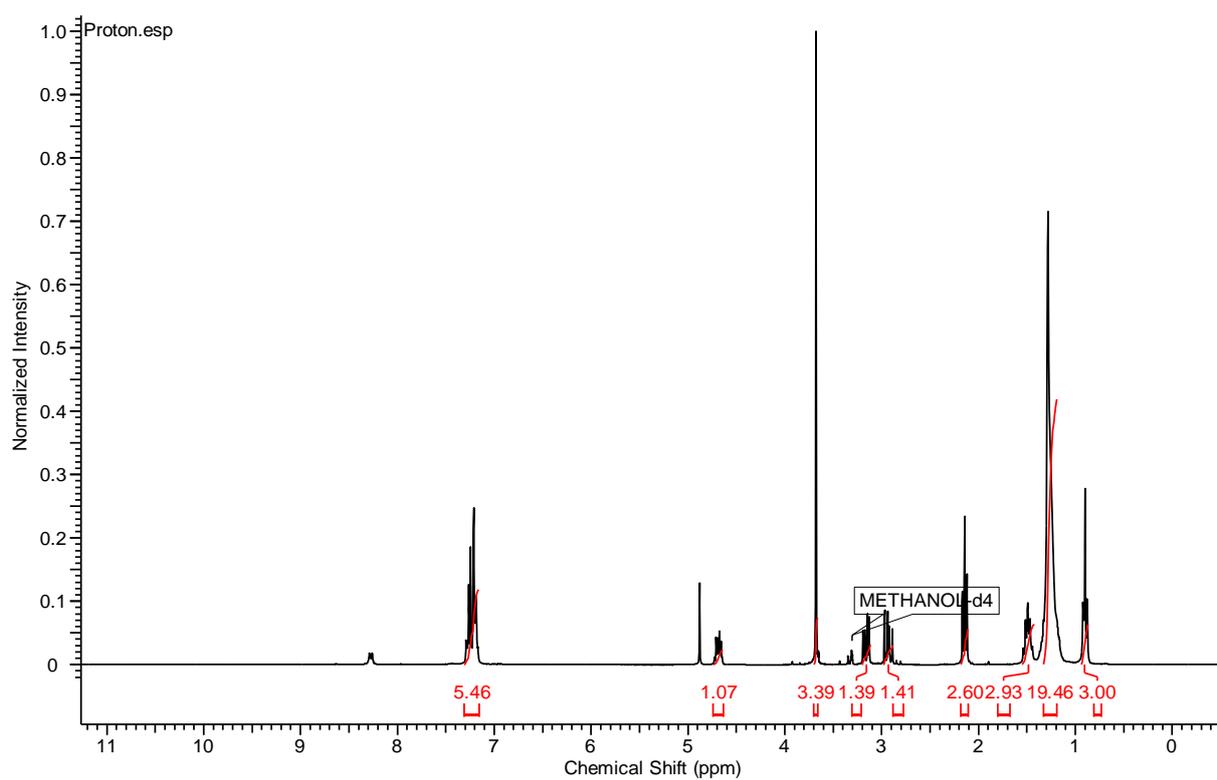


Figure S52. ^1H NMR spectrum for compound **15** in CD_3OD

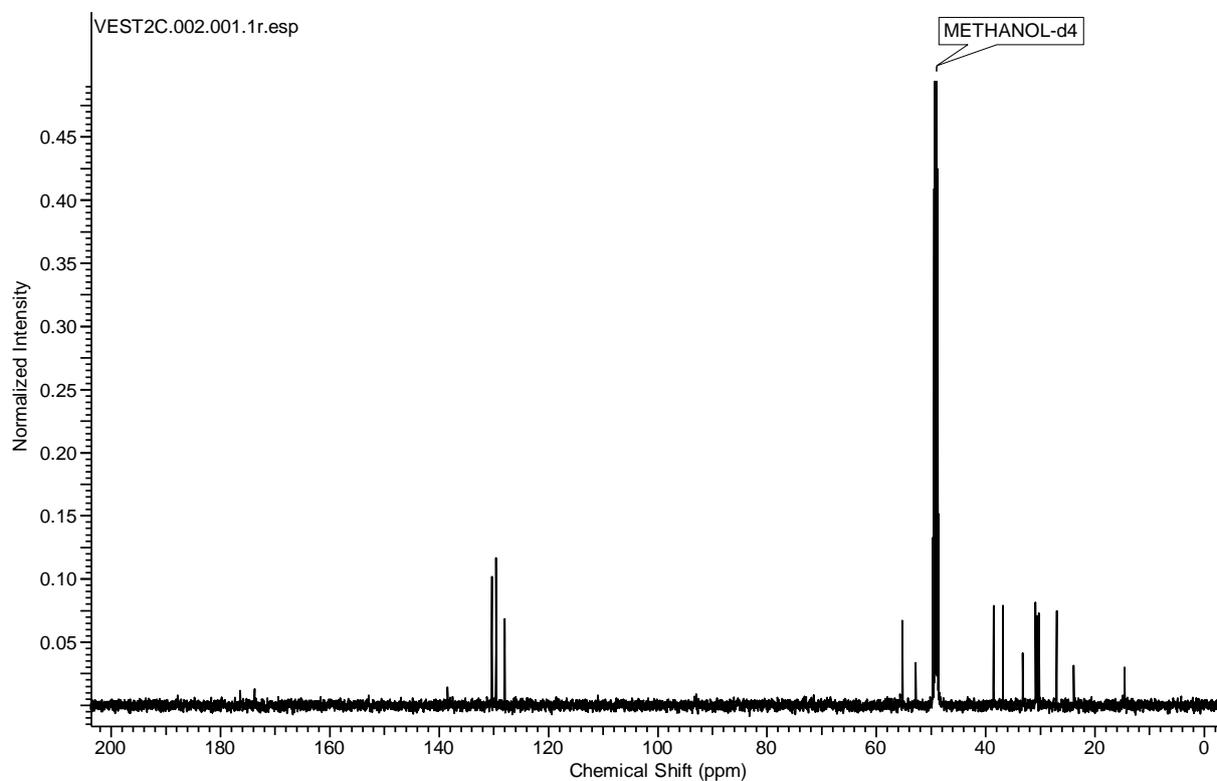


Figure S53. ^{13}C NMR spectrum for compound **15** in CD_3OD

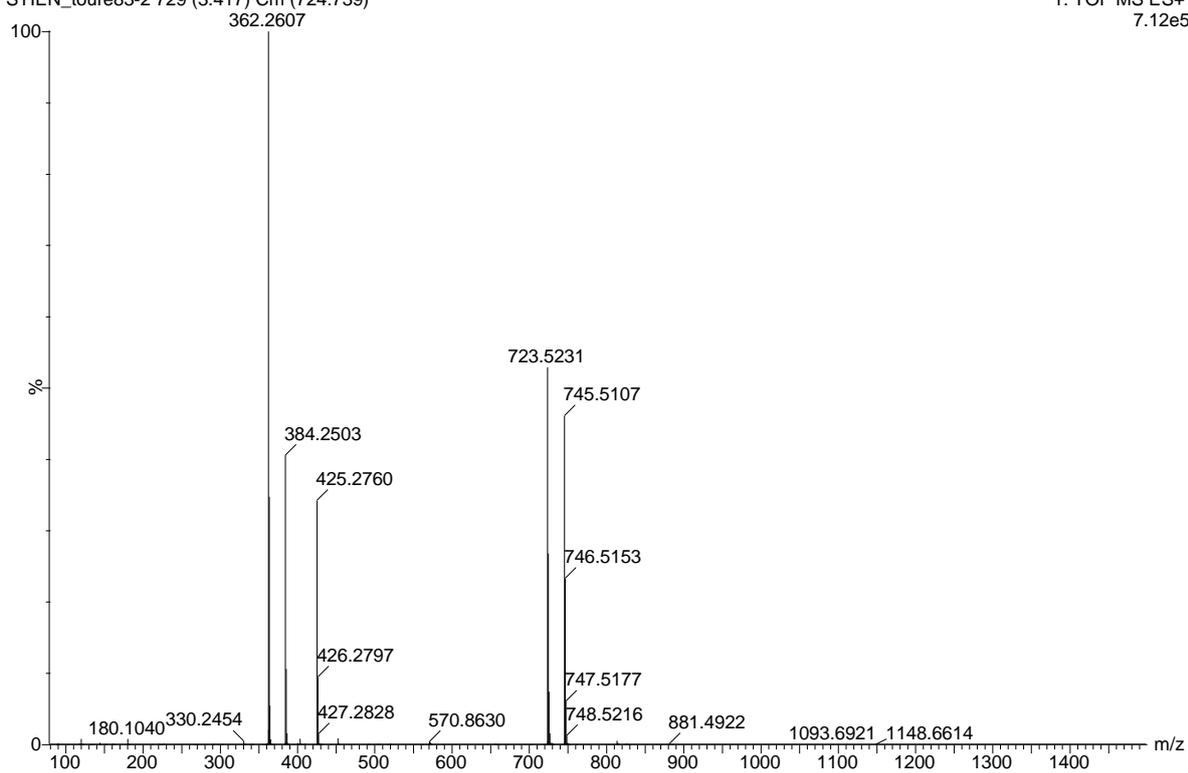


Figure S54. HRMS of compound **15** in MeOH

Spectroscopic data of compound 16

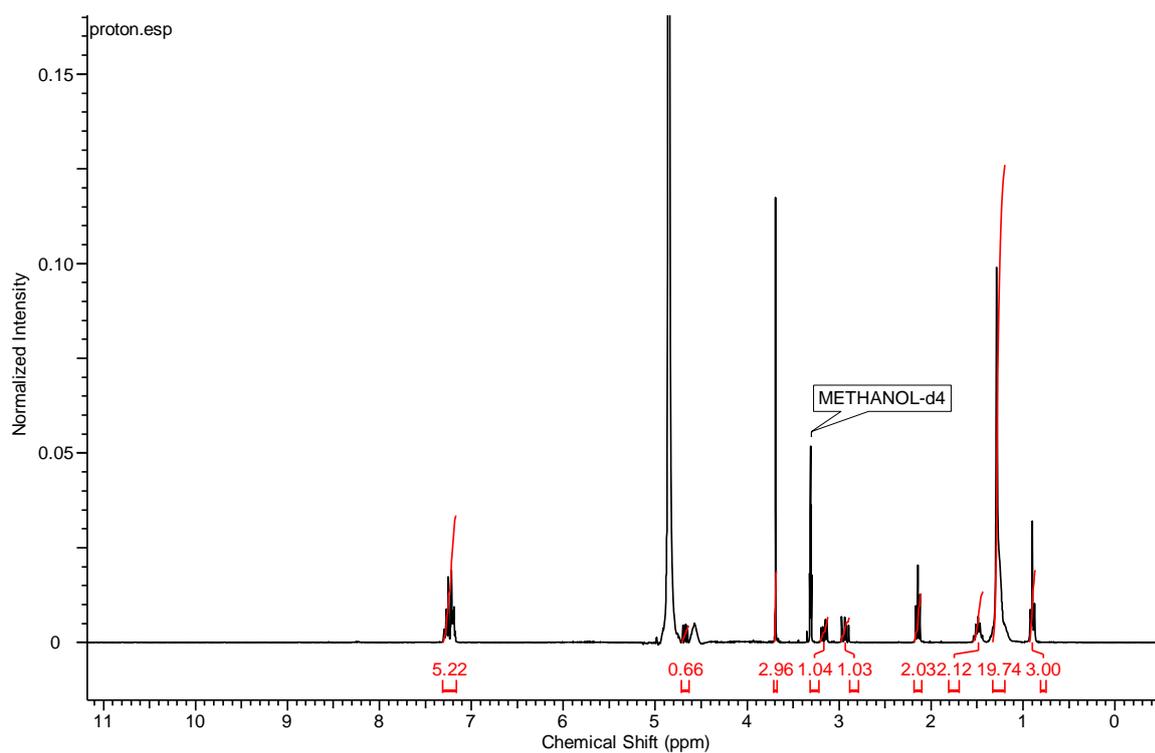


Figure S55. ^1H NMR spectrum for compound **16** in CD_3OD

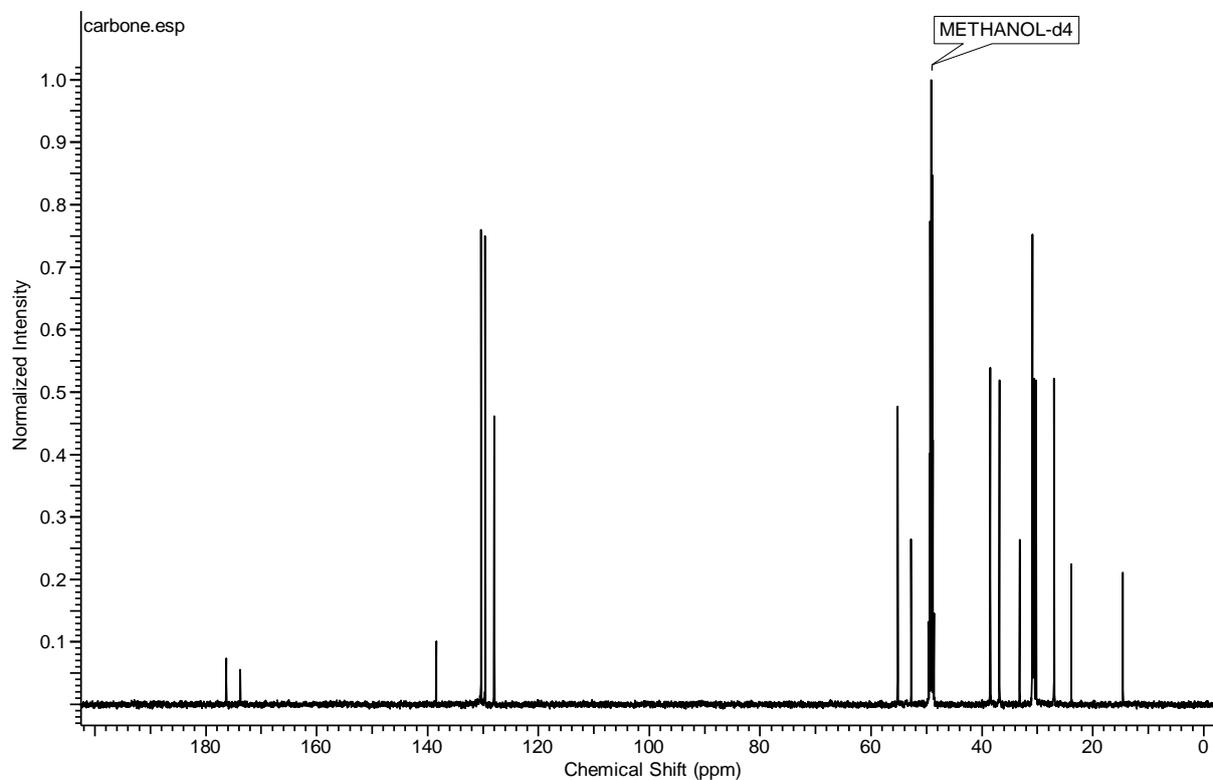


Figure S56. ^{13}C NMR spectrum for compound **16** in CD_3OD

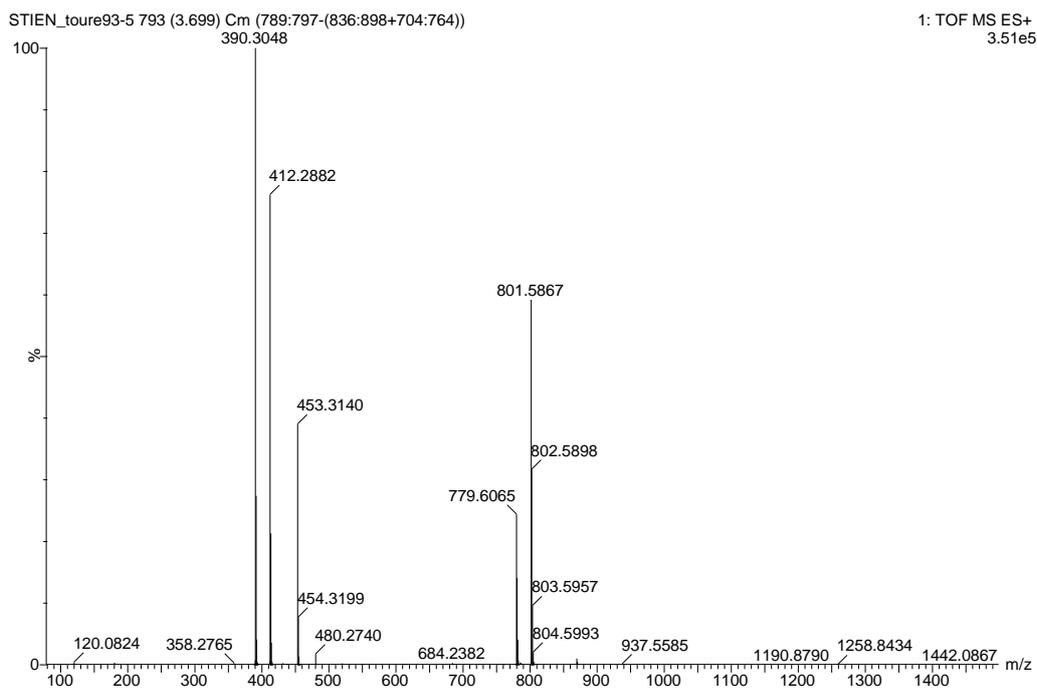


Figure S57. HRMS of compound **16** in MeOH

Spectroscopic data of compound **17**

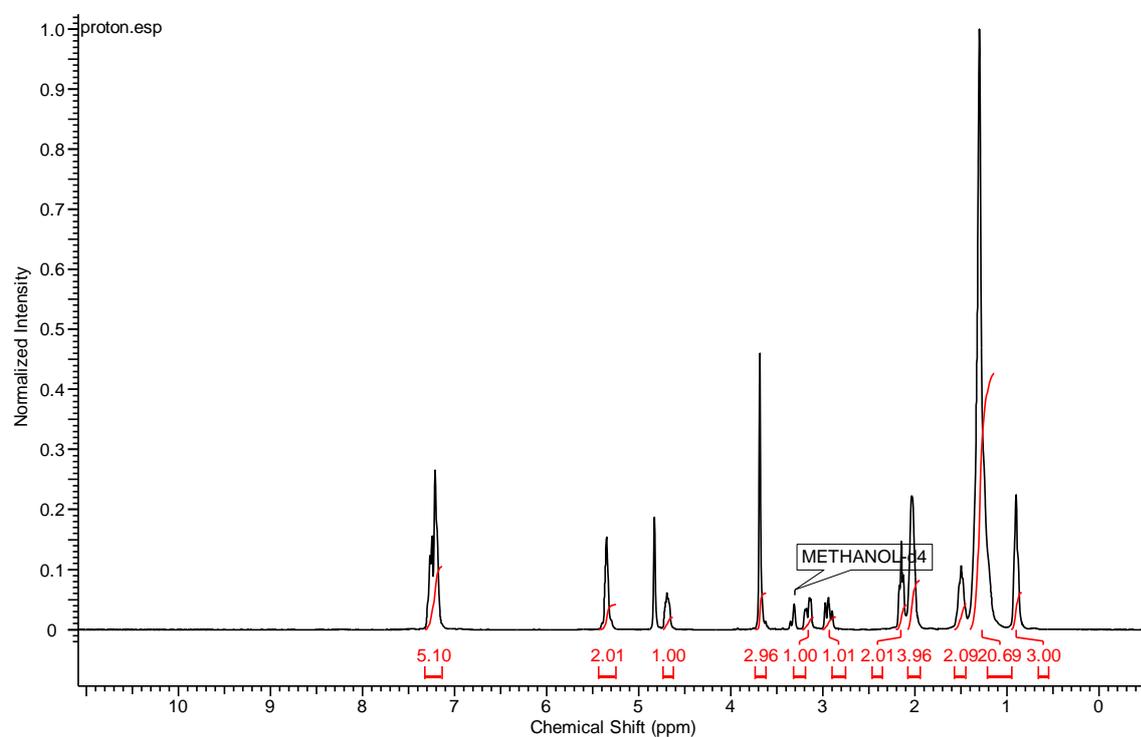


Figure S58. ^1H NMR spectrum for compound **17** in CD_3OD

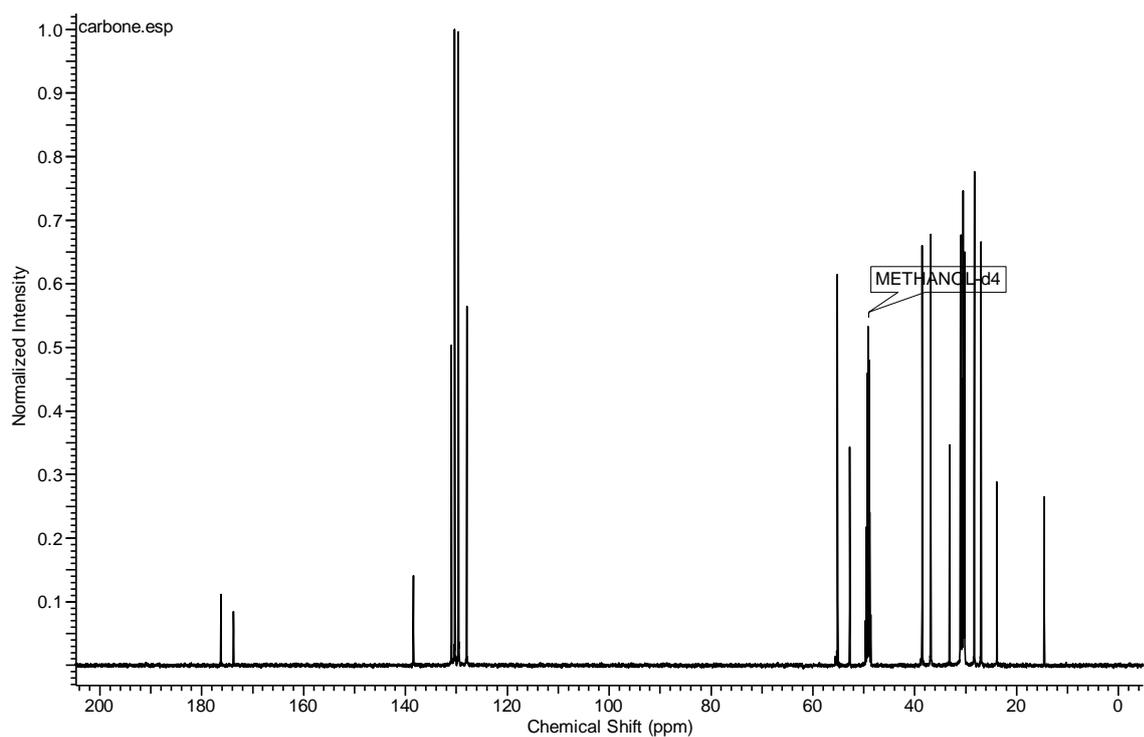


Figure S59. ^{13}C NMR spectrum for compound **17** in CD_3OD

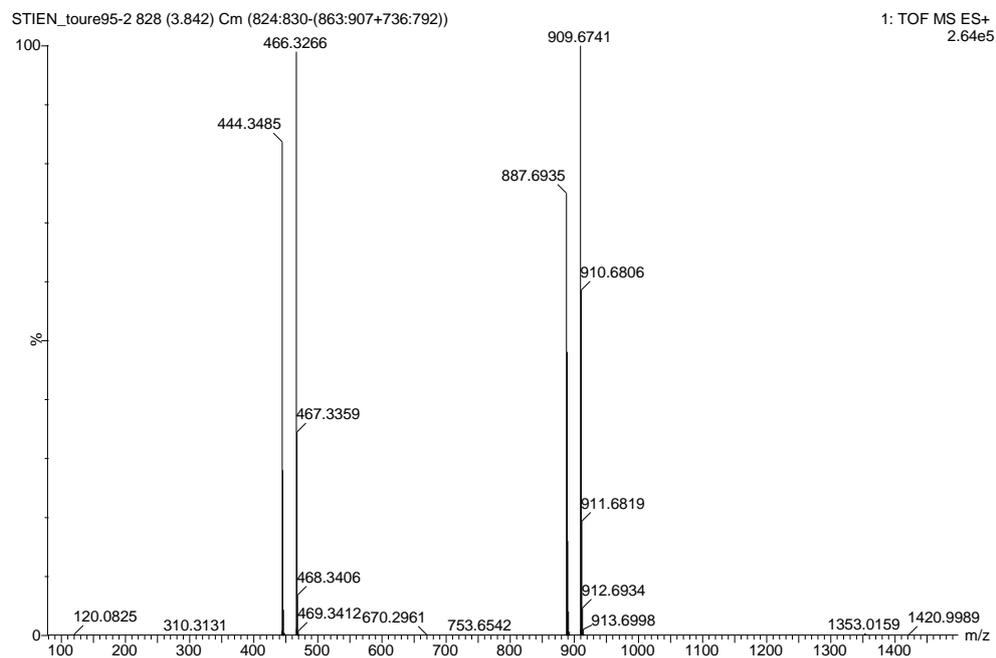


Figure S60. HRMS of compound **17** in MeOH

Spectroscopic data of compound **18**

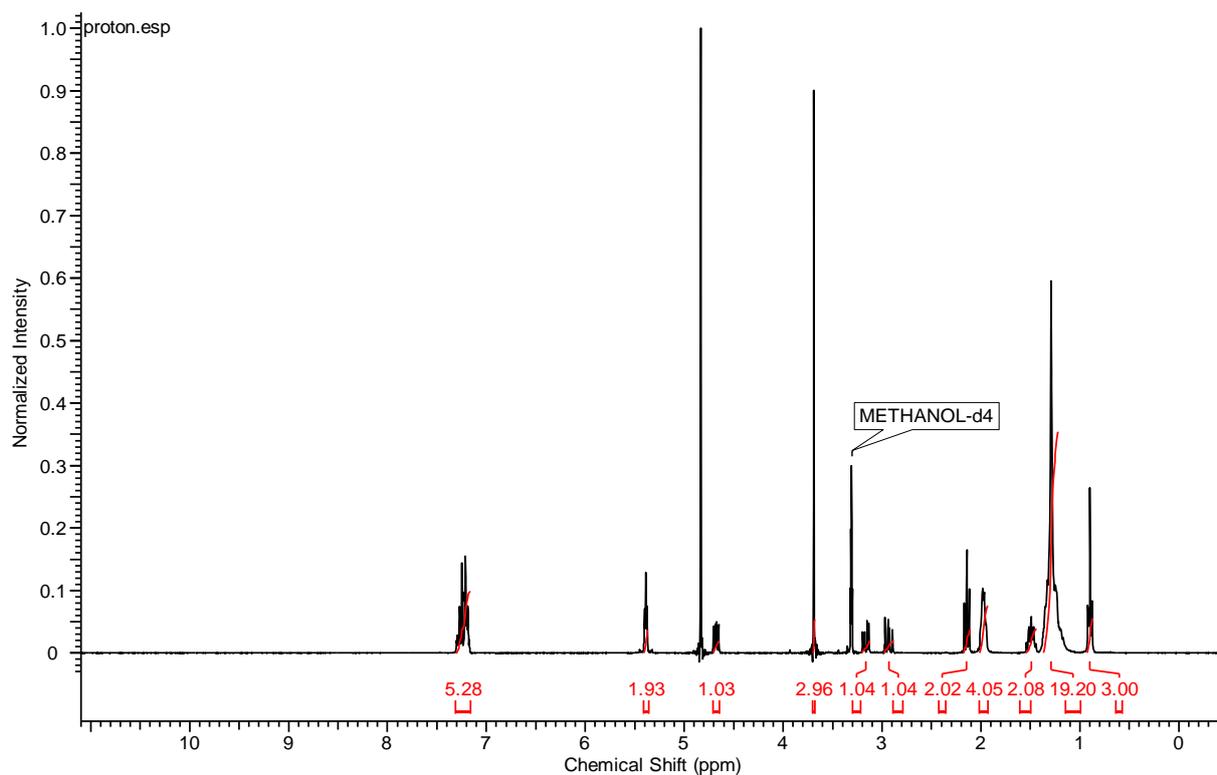


Figure S61. ^1H NMR spectrum for compound **18** in CD_3OD

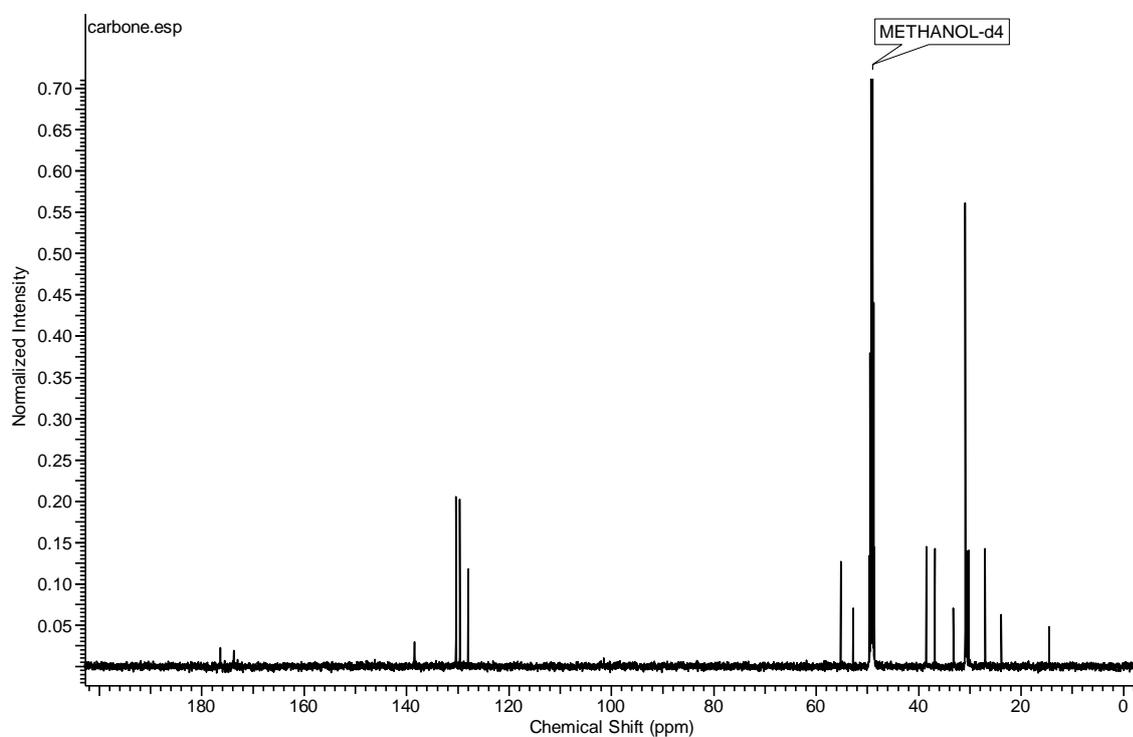


Figure S62. ^{13}C NMR spectrum for compound **18** in CD_3OD

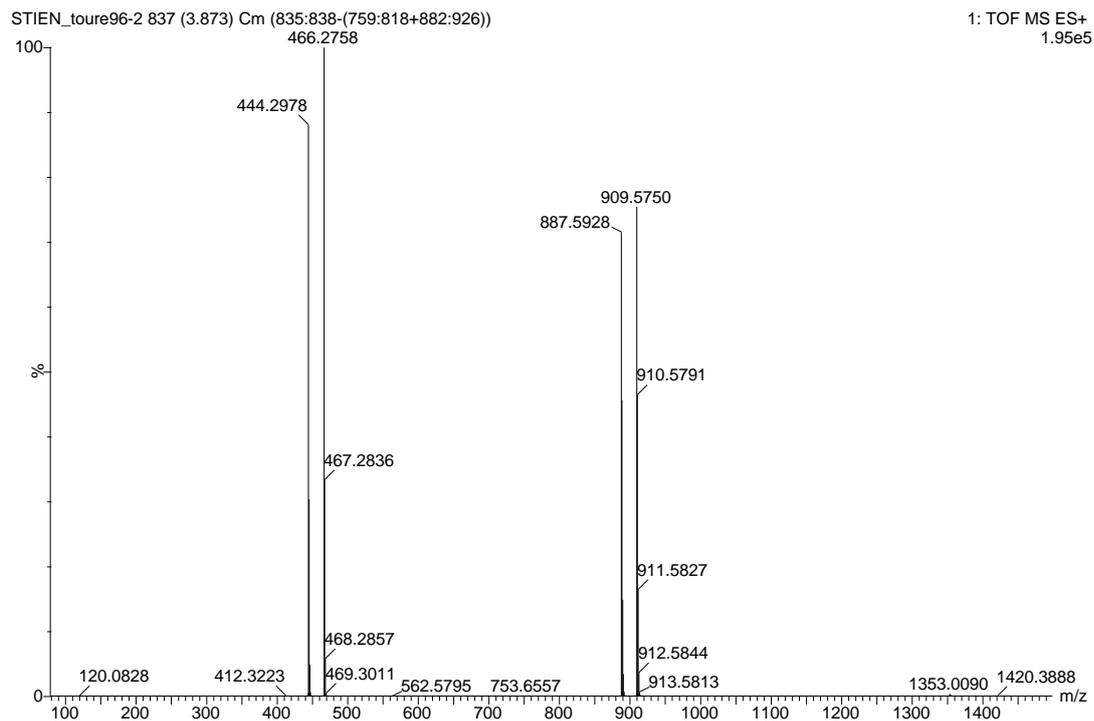


Figure S63. HRMS of compound **18** in MeOH

Spectroscopic data of compound **19**

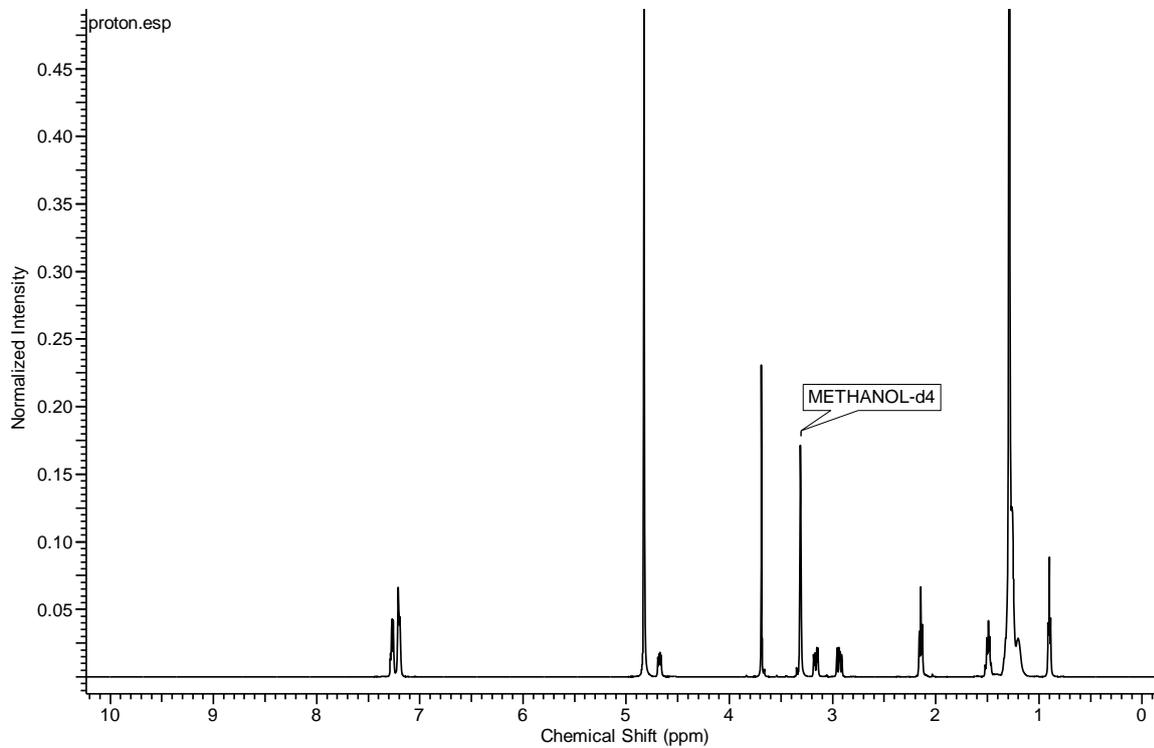


Figure S64. ^1H NMR spectrum for compound **19** in CD_3OD

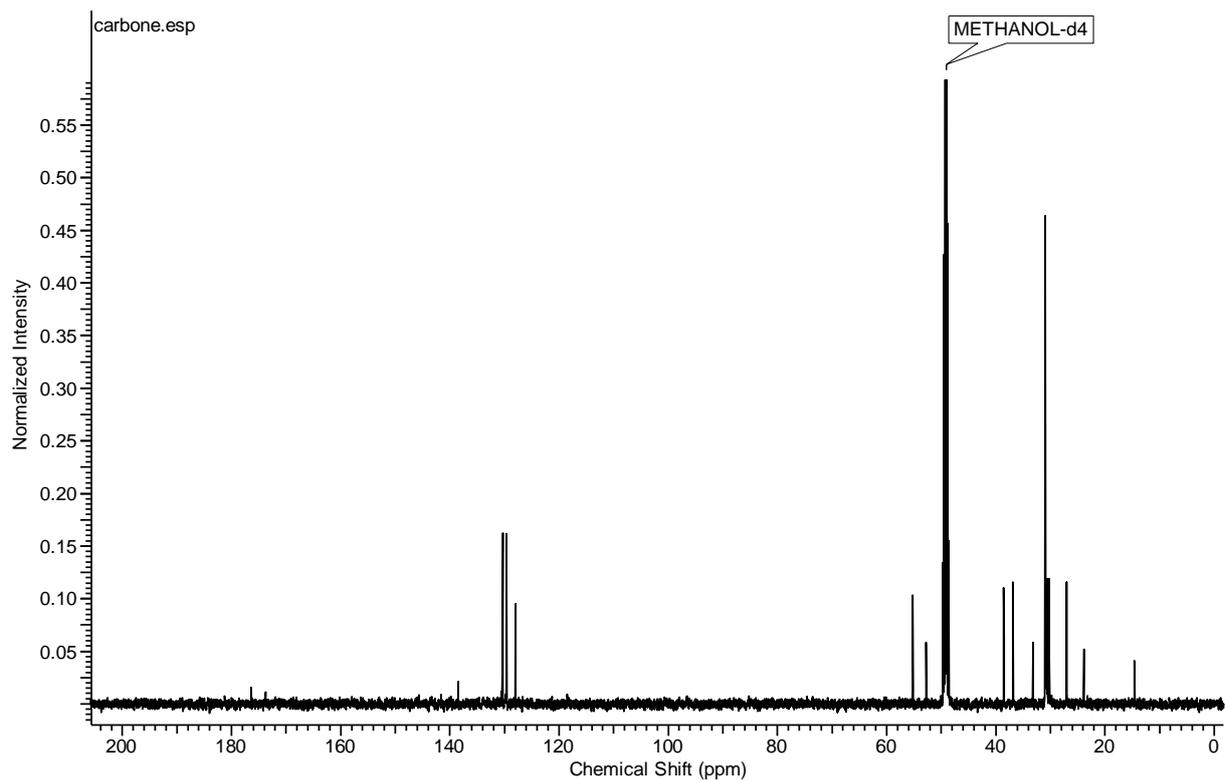


Figure S65. ^{13}C NMR spectrum for compound **19** in CD_3OD

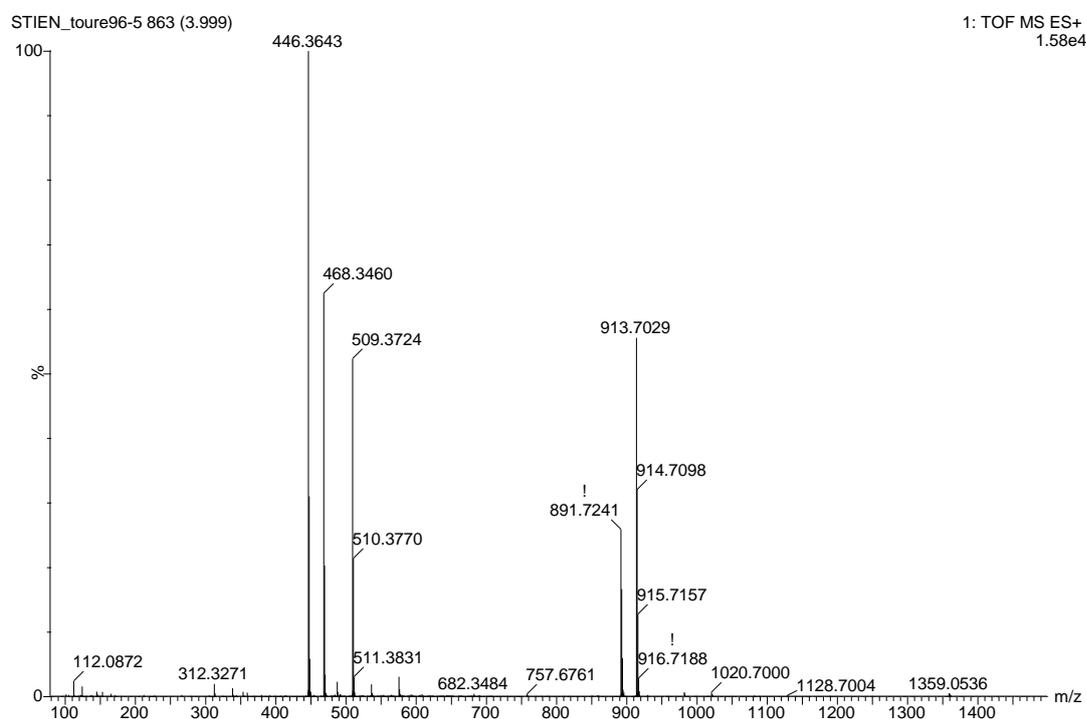


Figure S66. HRMS of compound **19** in MeOH

Spectroscopic data of compound 20

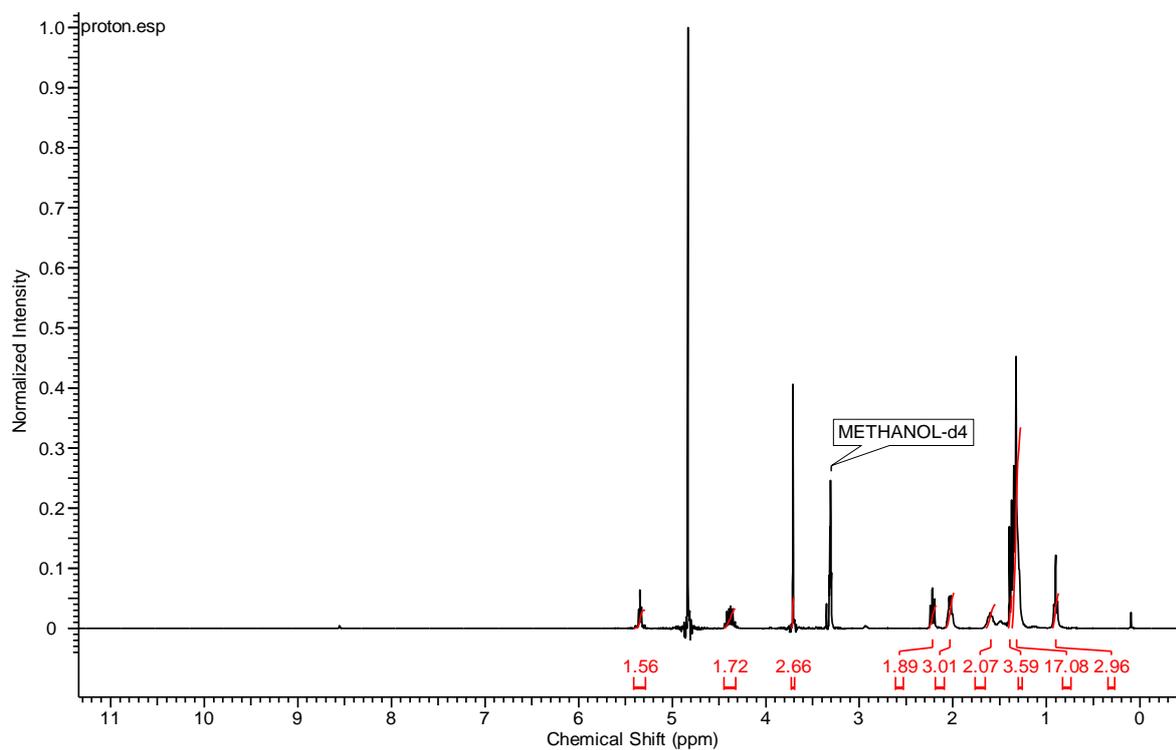


Figure S67. ^1H NMR spectrum for compound **20** in CD_3OD

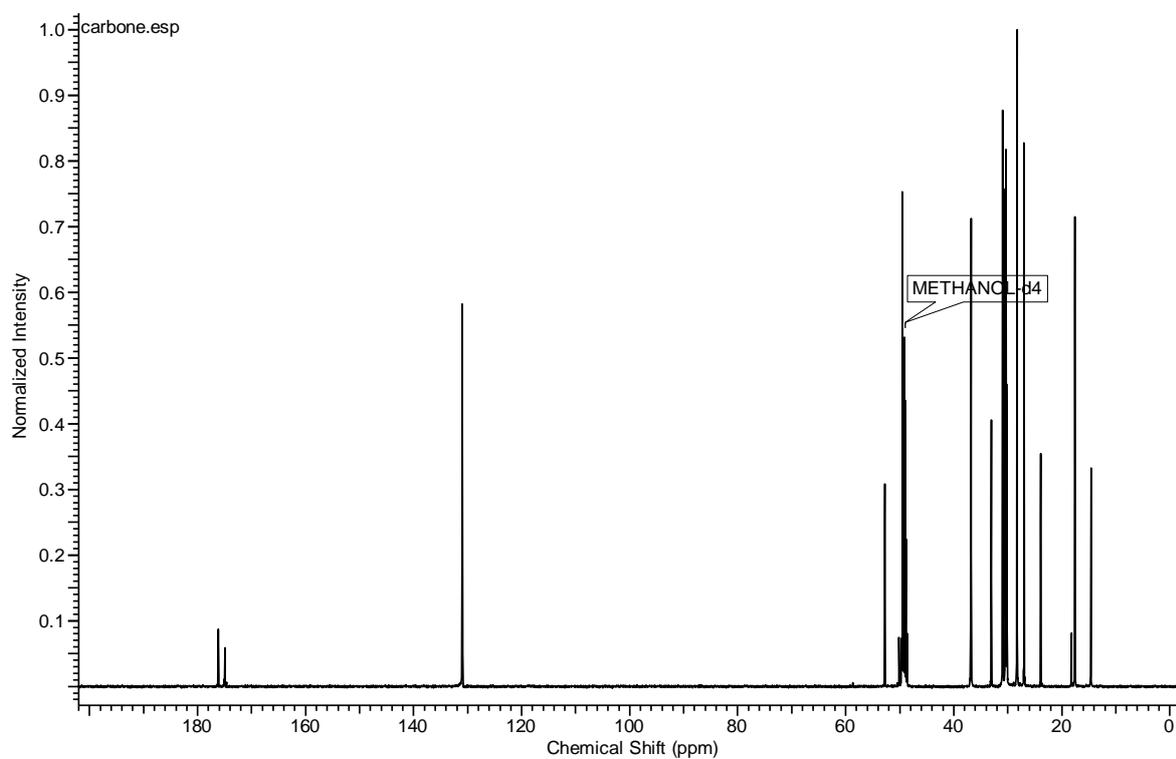


Figure S68. ^{13}C NMR spectrum for compound **20** in CD_3OD

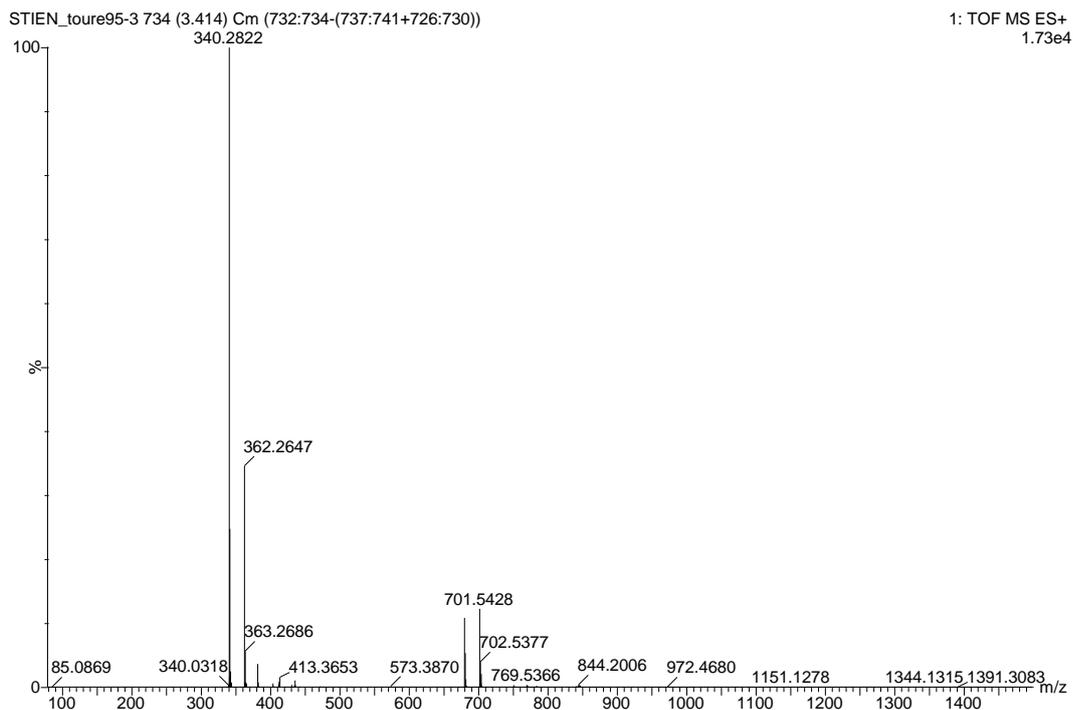


Figure S69. HRMS of compound **20** in MeOH

Spectroscopic data of compound **21**

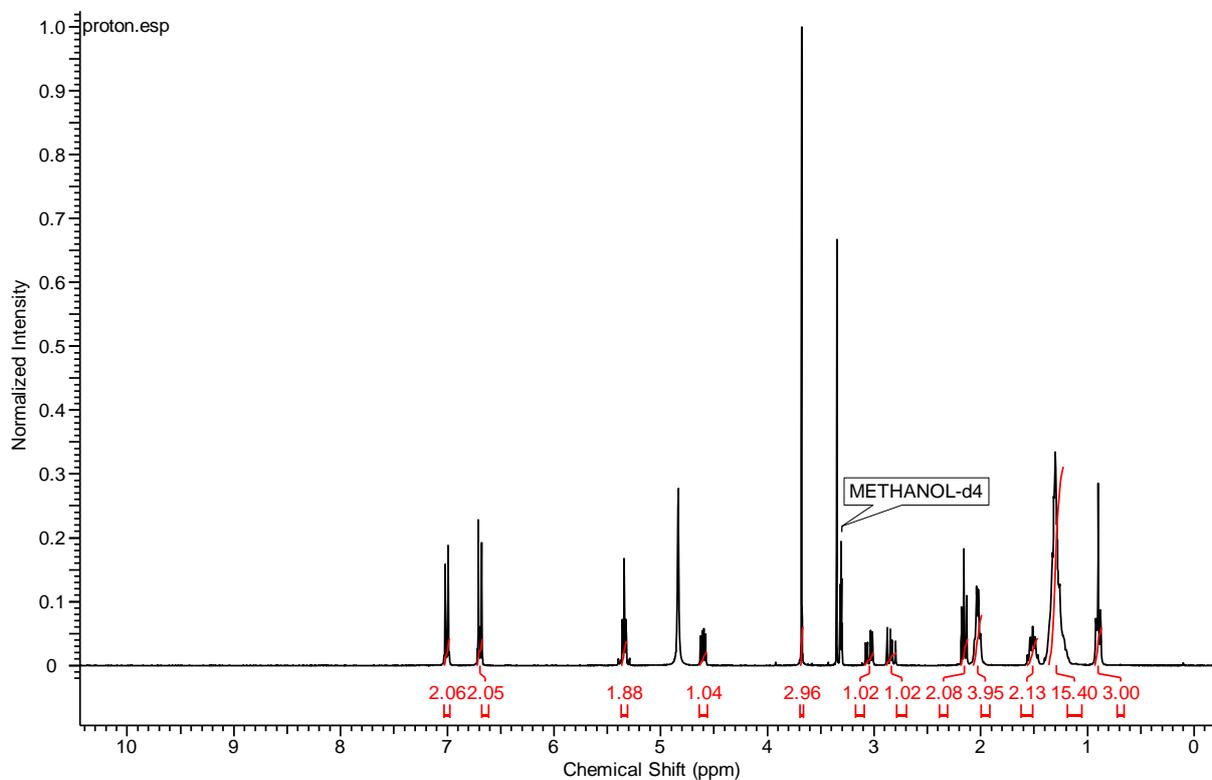


Figure S70. ¹H NMR spectrum for compound **21** in CD₃OD

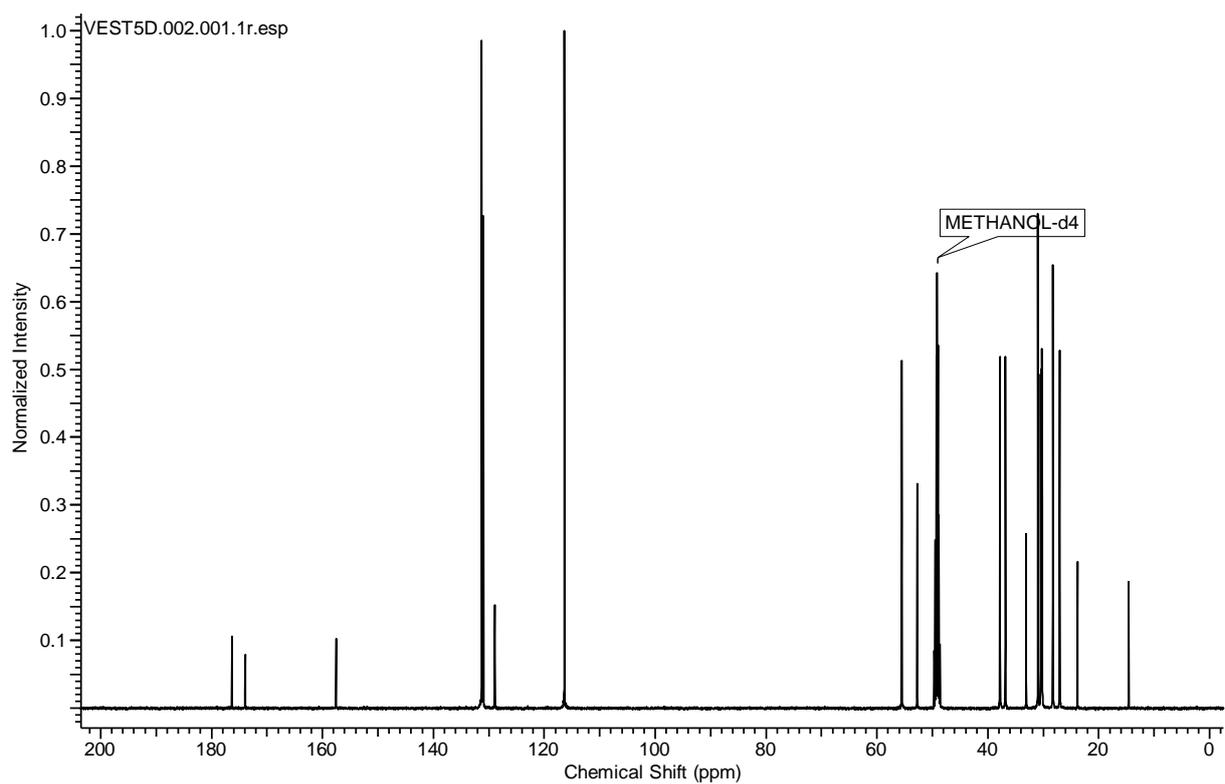


Figure S71. ^{13}C NMR spectrum for compound **21** in CD_3OD

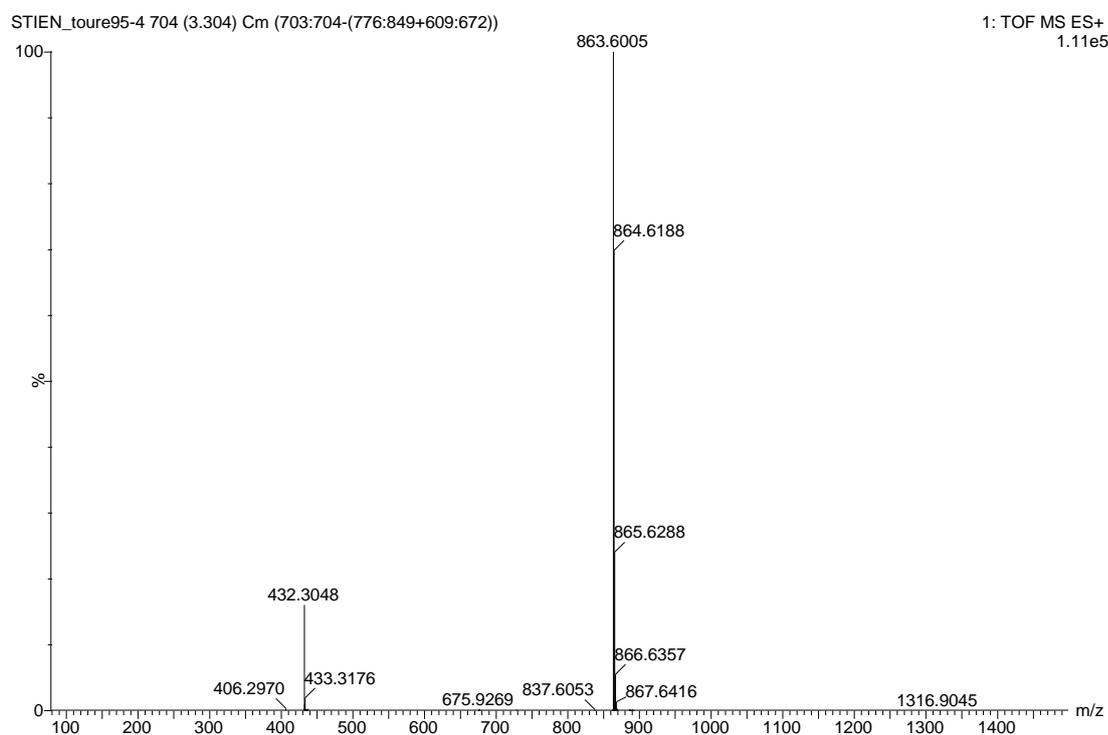


Figure S72. HRMS of compound **21** in MeOH

Spectroscopic data of compound 22

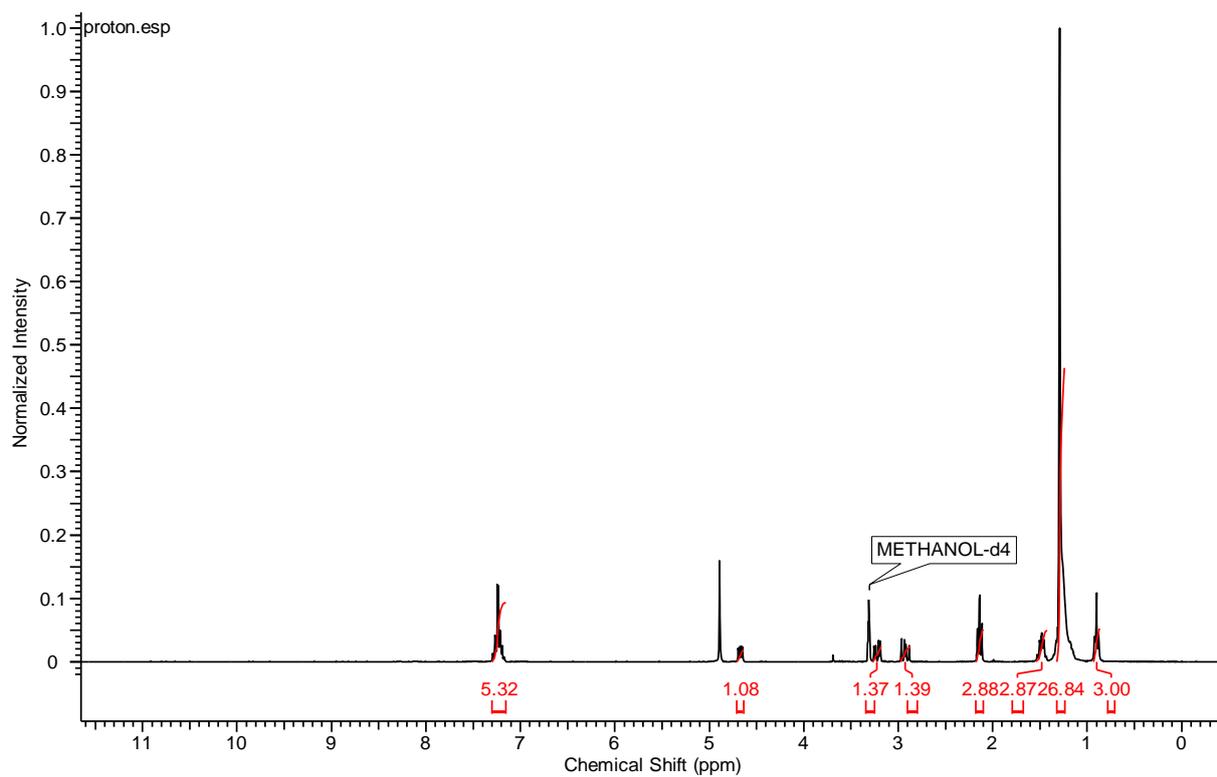


Figure S73. ^1H NMR spectrum for compound 22 in CD_3OD

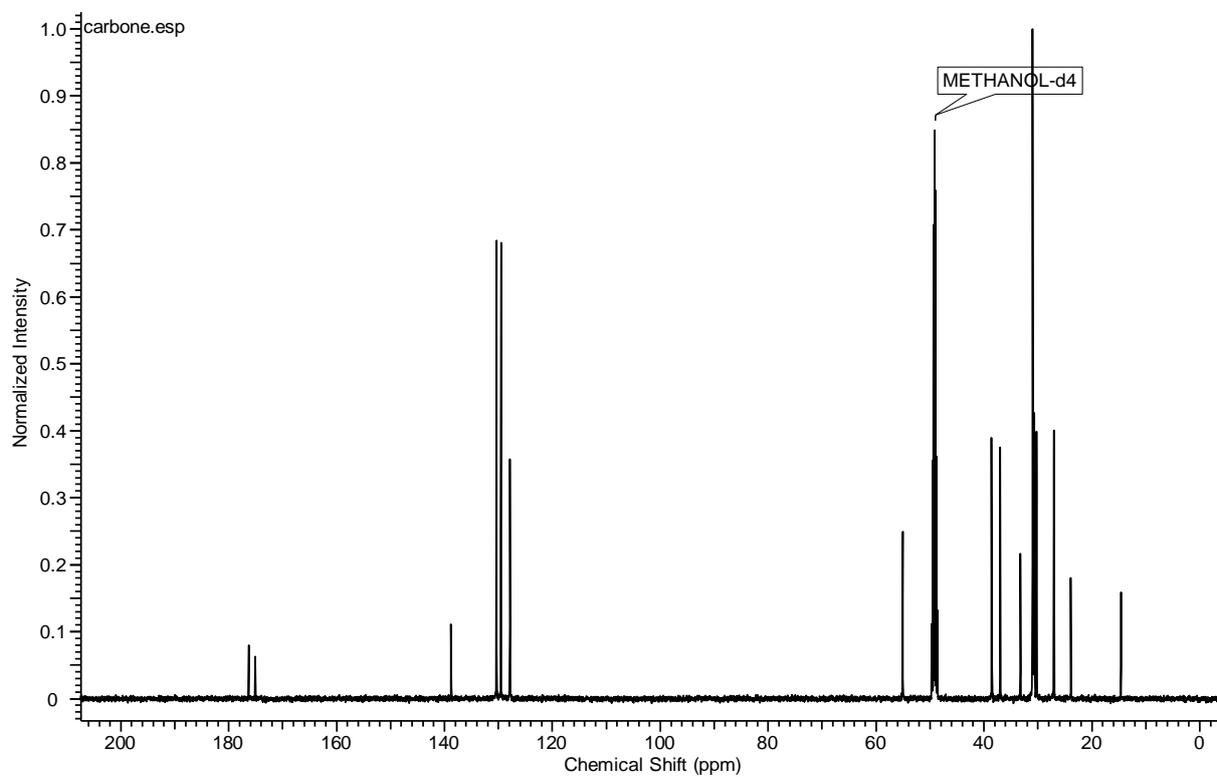


Figure S74. ^{13}C NMR spectrum for compound 22 in CD_3OD

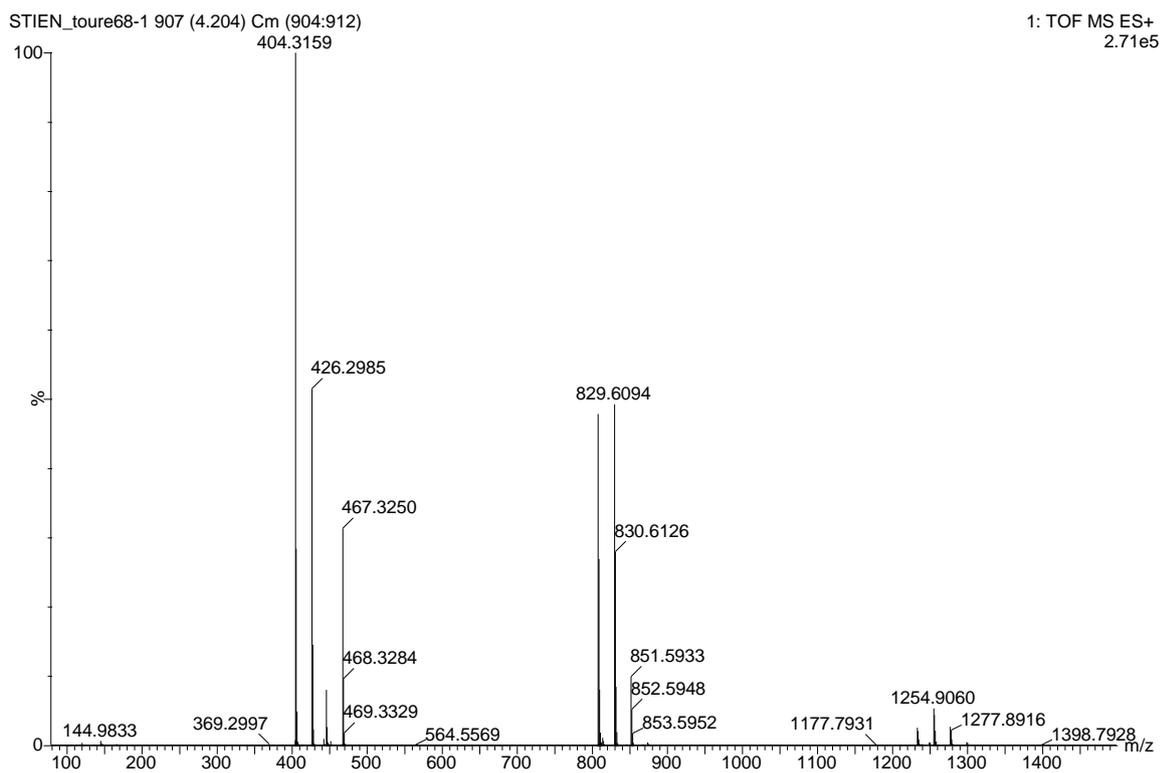


Figure S75. HRMS of compound **22** in MeOH

Spectroscopic data of compound **23**

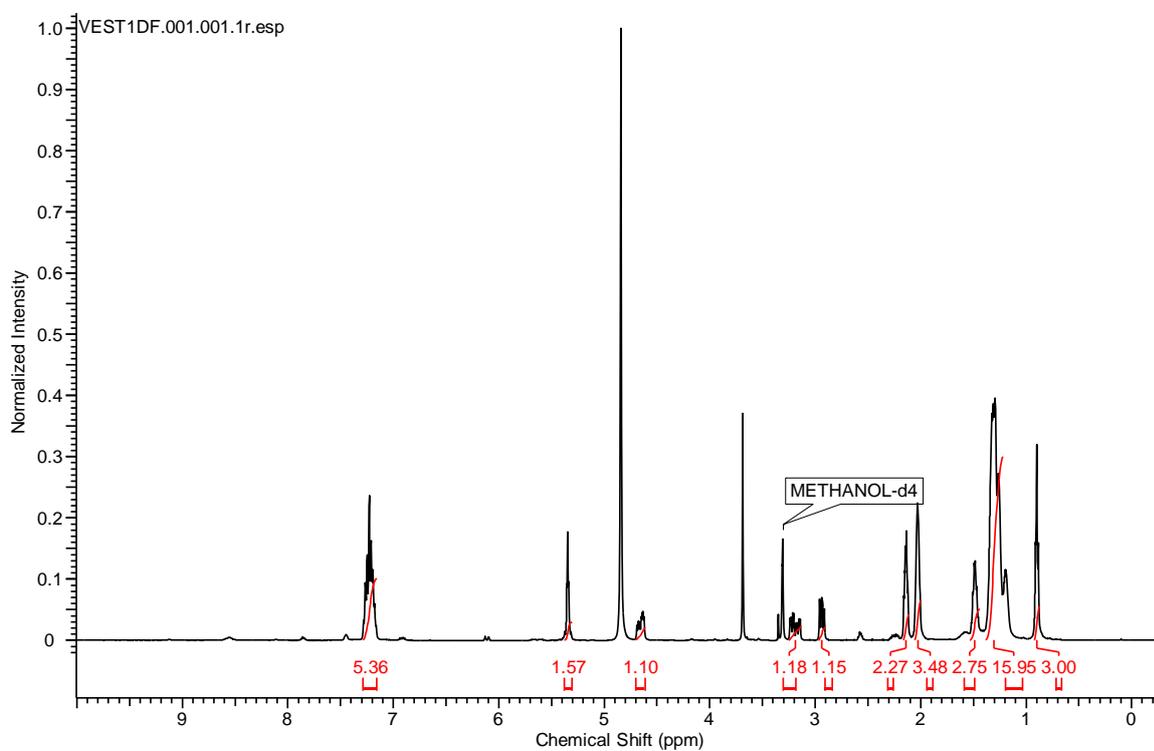


Figure S76. ^1H NMR spectrum for compound **23** in CD_3OD

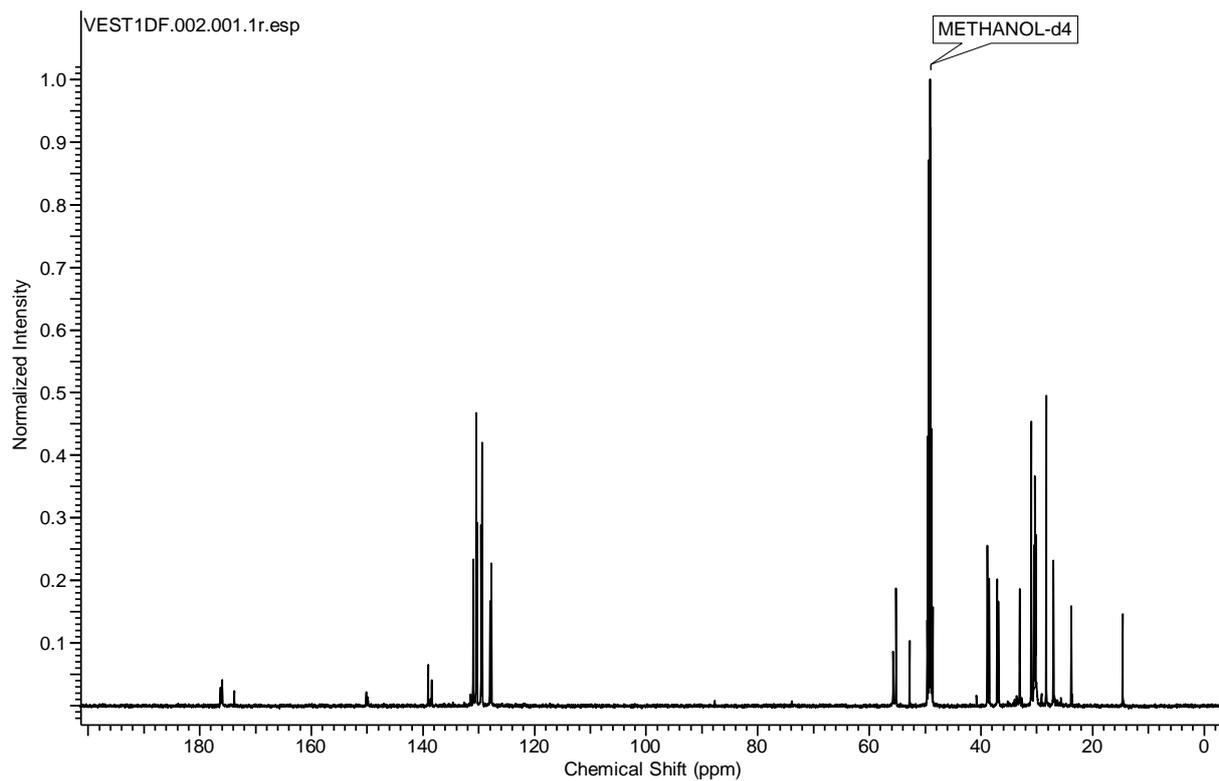


Figure S77. ^{13}C NMR spectrum for compound **23** in CD_3OD

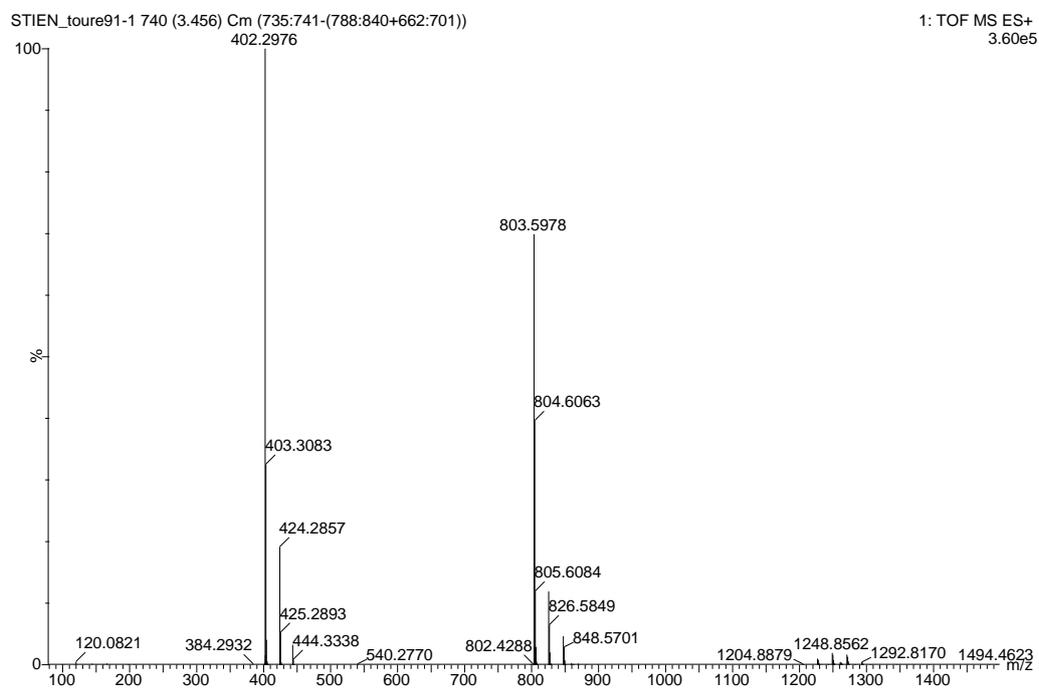


Figure S78. HRMS of compound **23** in MeOH

Spectroscopic data of compound 24

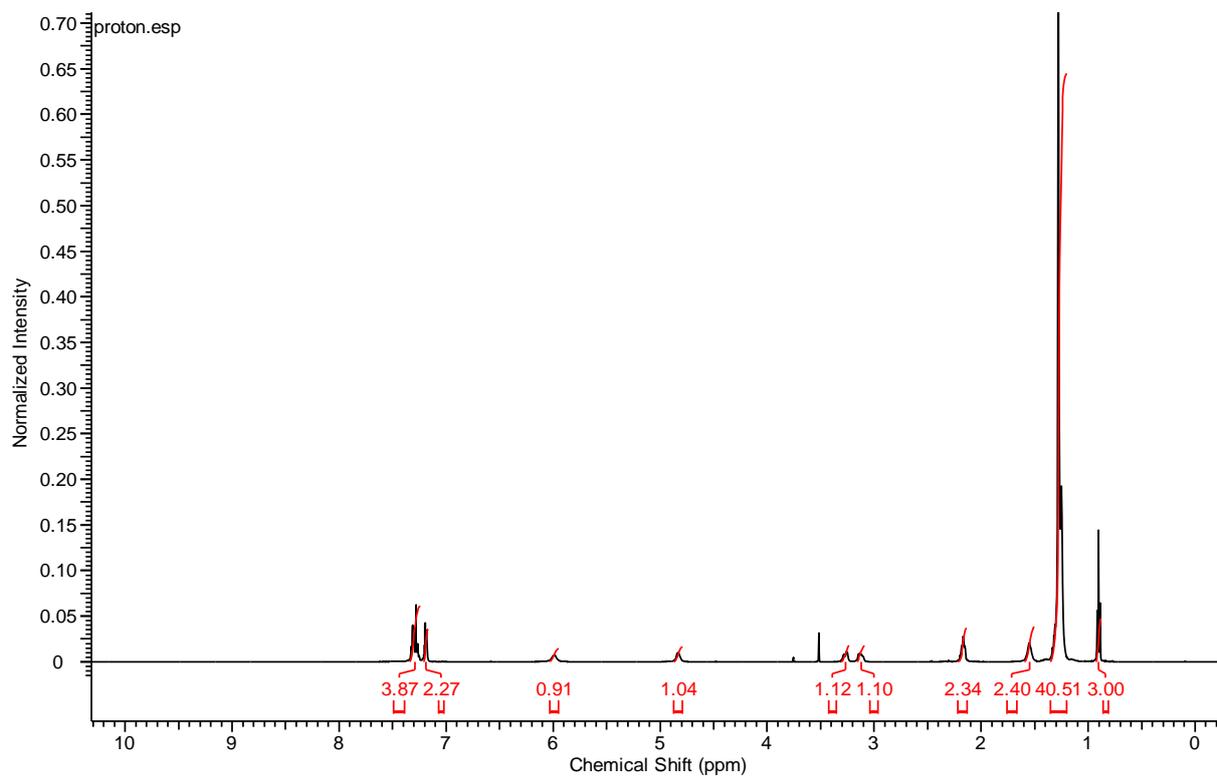


Figure S79. ^1H NMR spectrum for compound **24** in CD_3OD

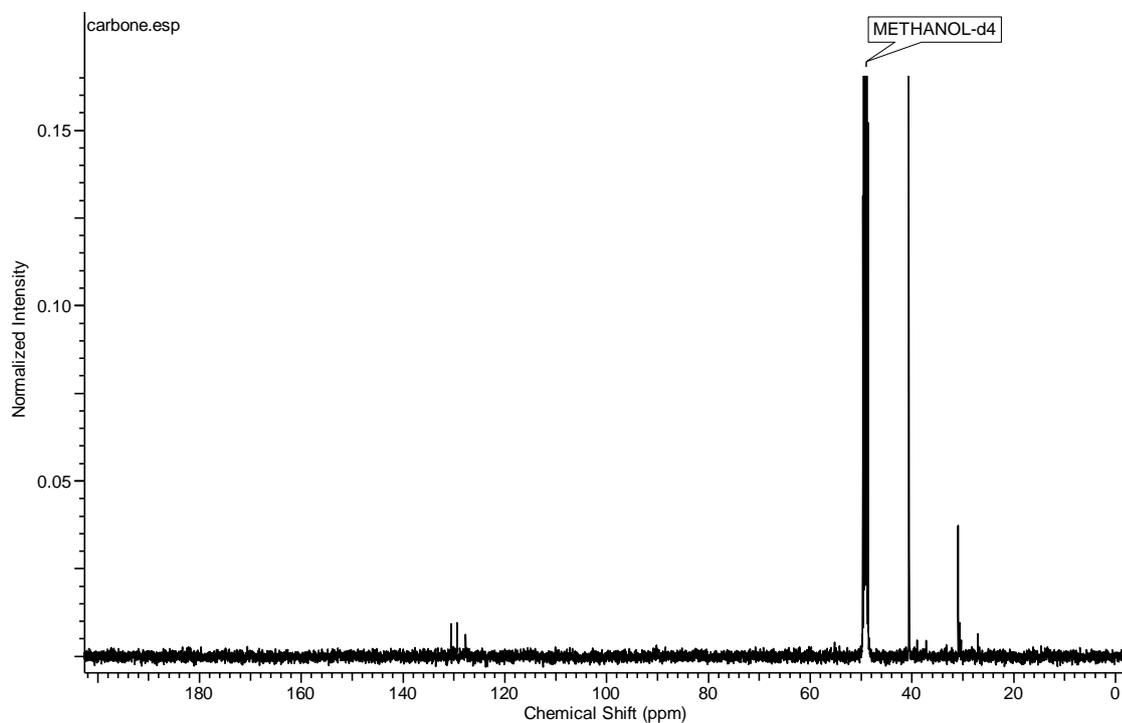


Figure S80. ^{13}C NMR spectrum for compound **24** in CD_3OD

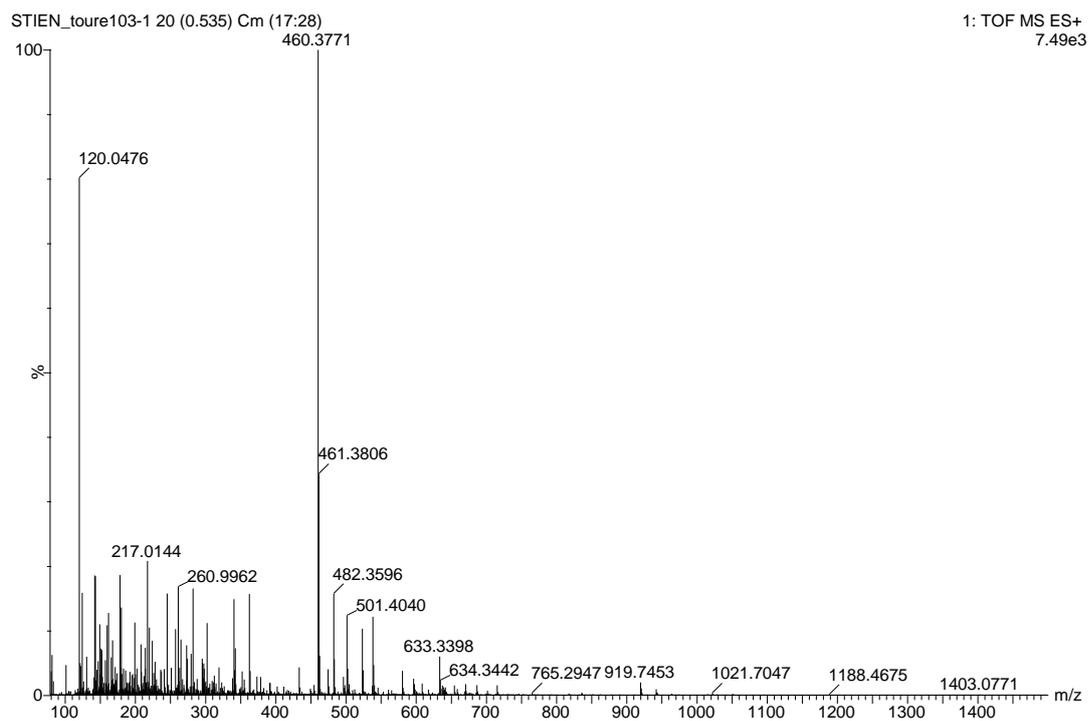


Figure S81. HRMS of compound **24** in MeOH

Spectroscopic data of compound 25

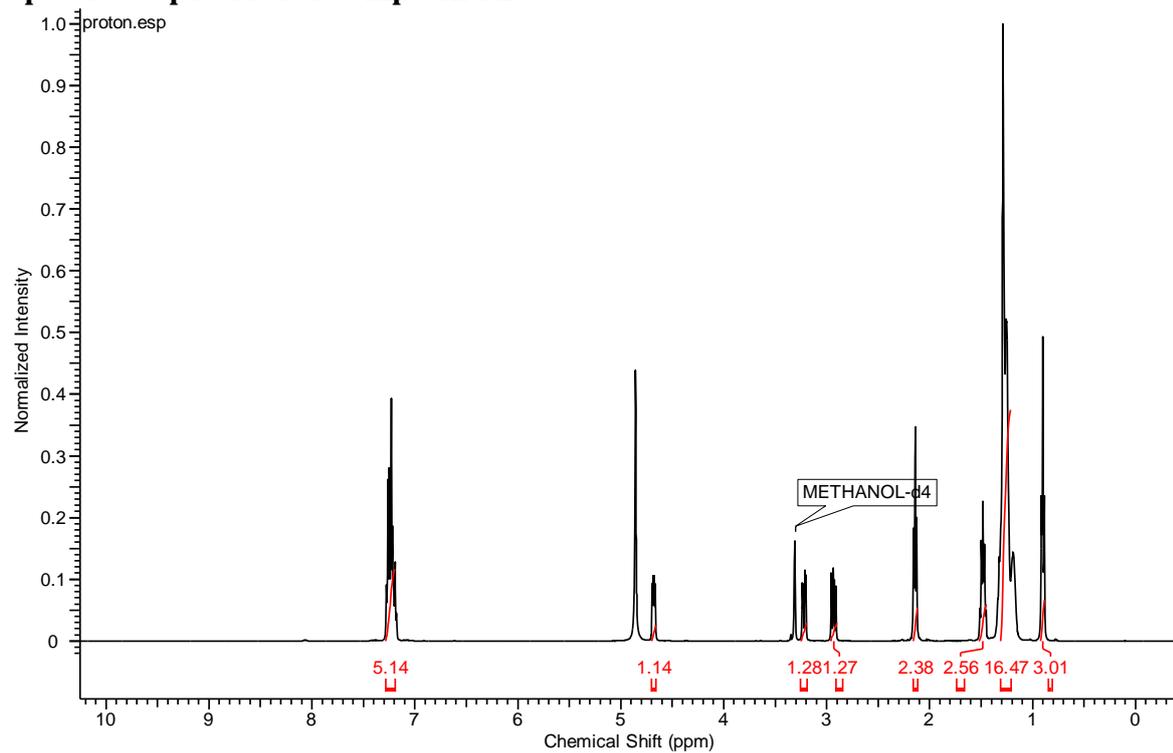


Figure S82. ^1H NMR spectrum for compound **25** in CD_3OD

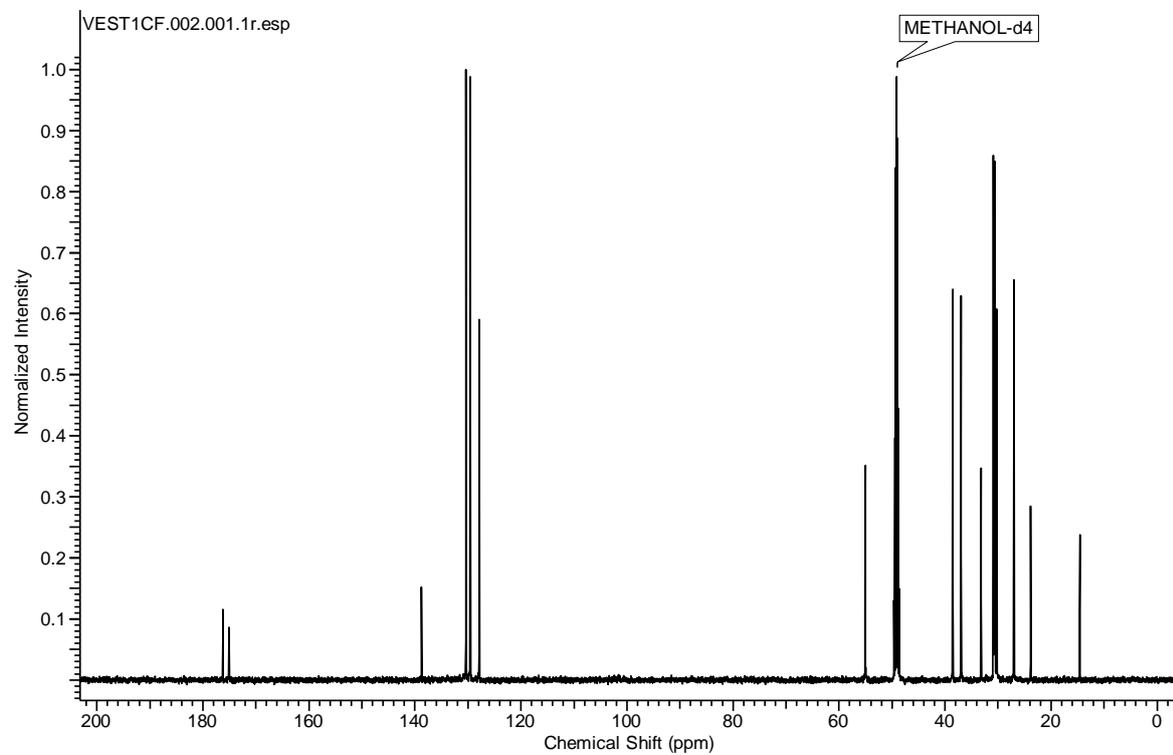


Figure S83. ^{13}C NMR spectrum for compound **25** in CD_3OD

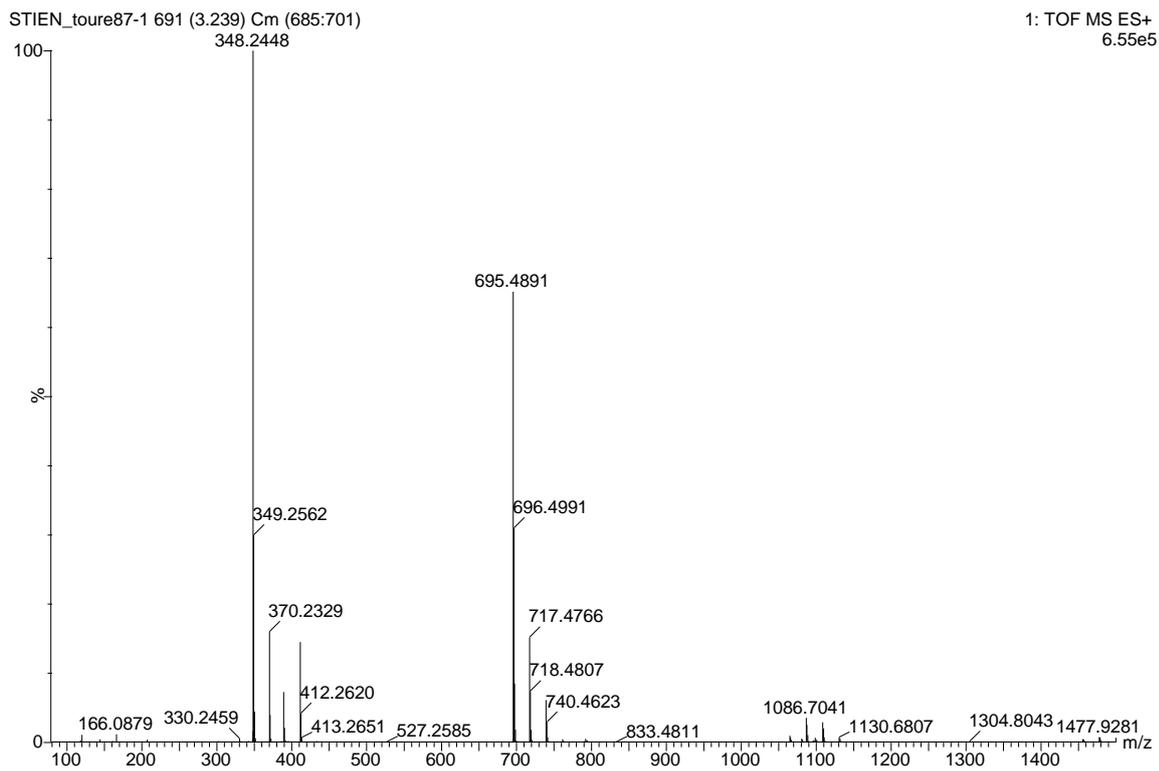


Figure S84. HRMS of compound **25** in MeOH

Spectroscopic data of compound **26**

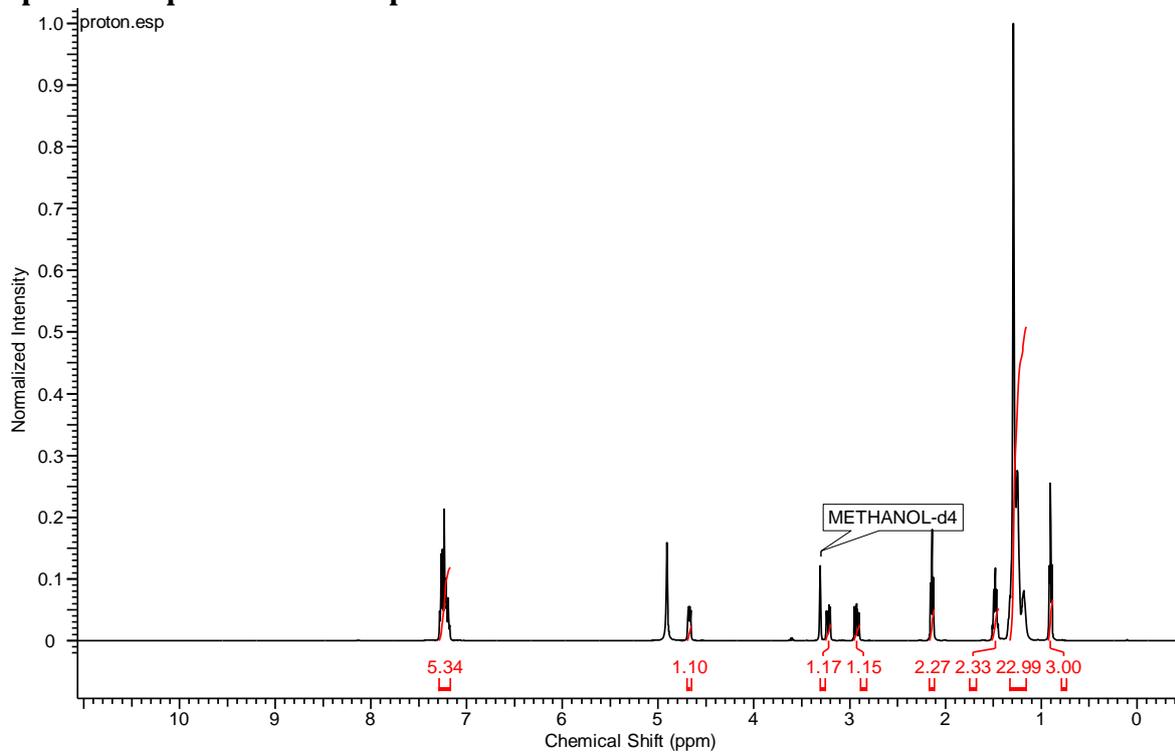


Figure S85. ^1H NMR spectrum for compound **26** in CD_3OD

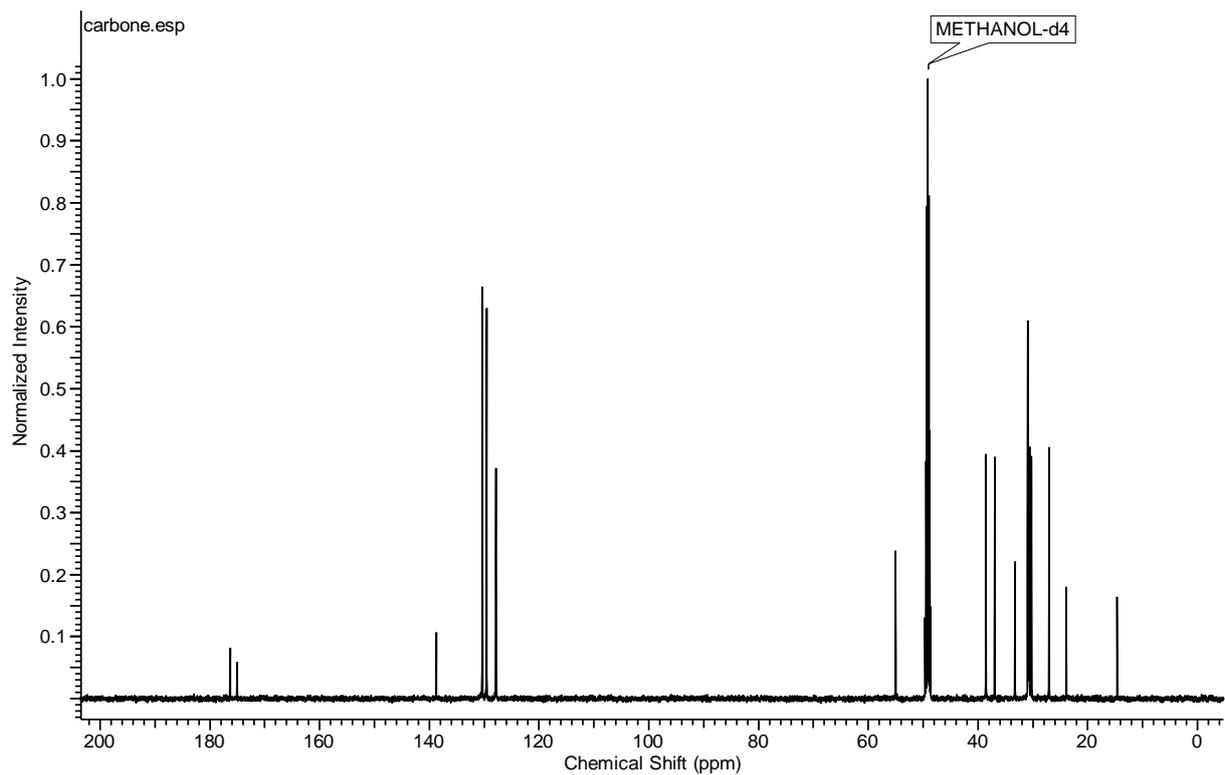


Figure S86. ^{13}C NMR spectrum for compound **26** in CD_3OD

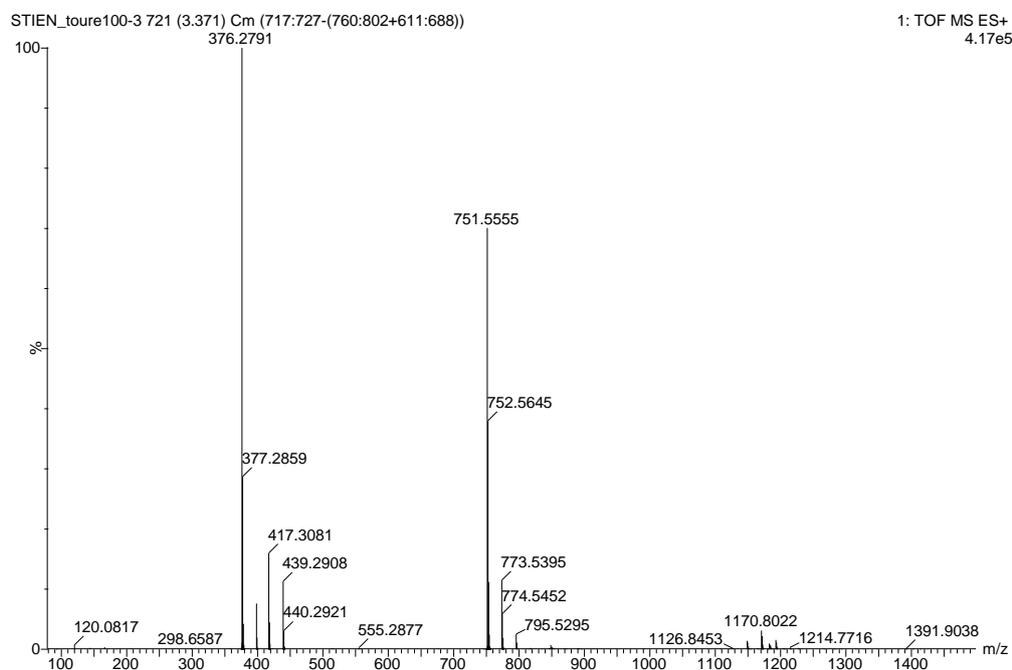


Figure S87. HRMS of compound **26** in MeOH

Spectroscopic data of compound 27

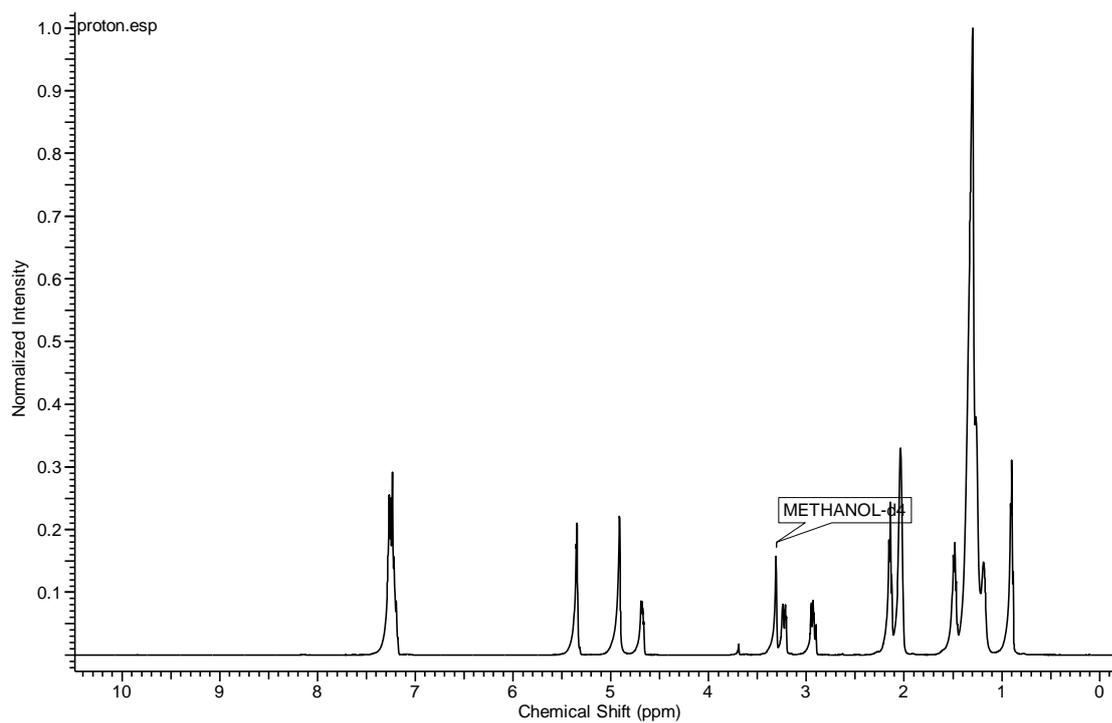


Figure S88. ¹H NMR spectrum for compound 27 in CD₃OD

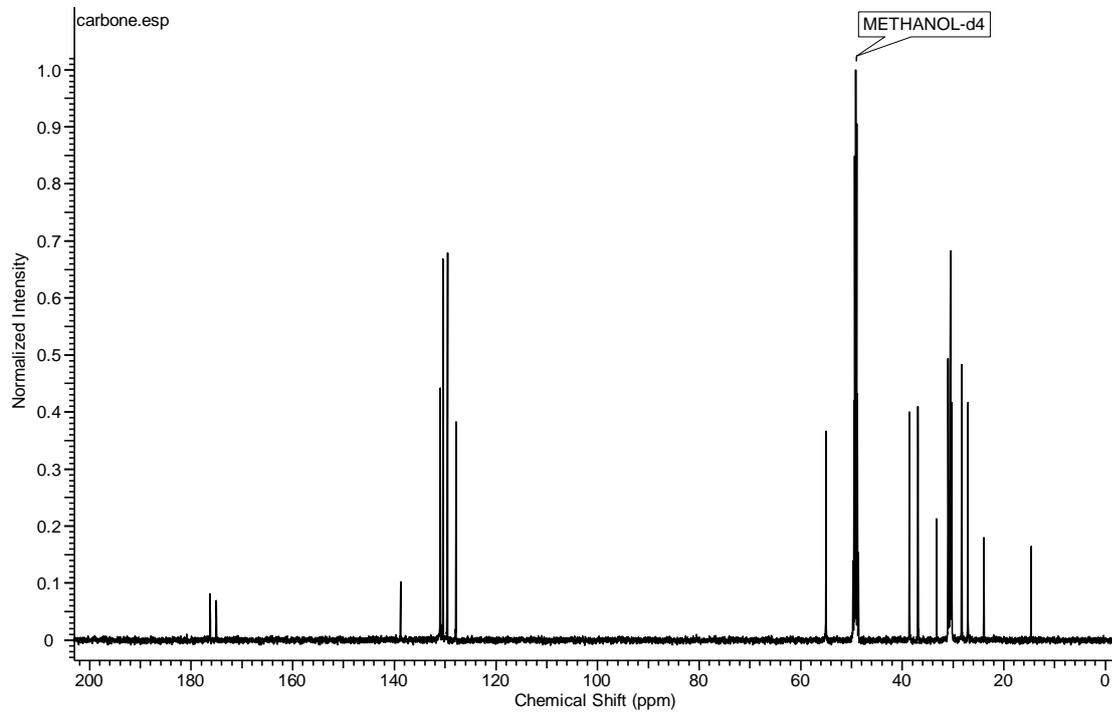


Figure S89. ¹³C NMR spectrum for compound 27 in CD₃OD

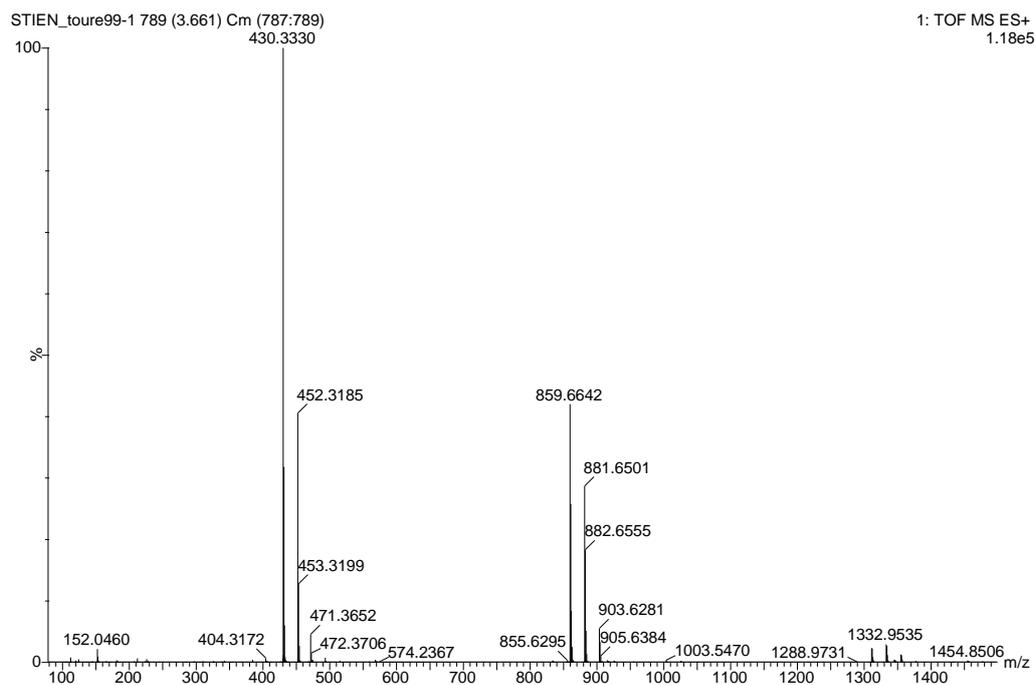


Figure S90. HRMS of compound **27** in MeOH

Spectroscopic data of compound **28**

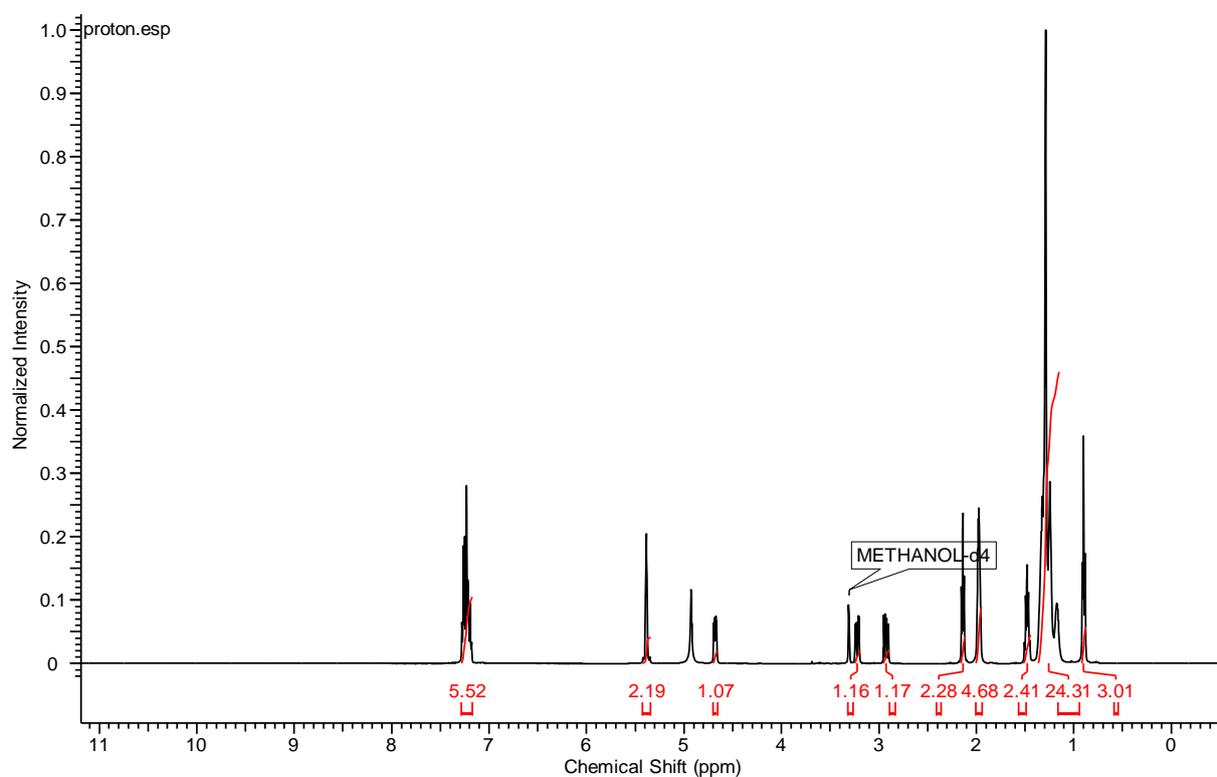


Figure S91. ^1H NMR spectrum for compound **28** in CD_3OD

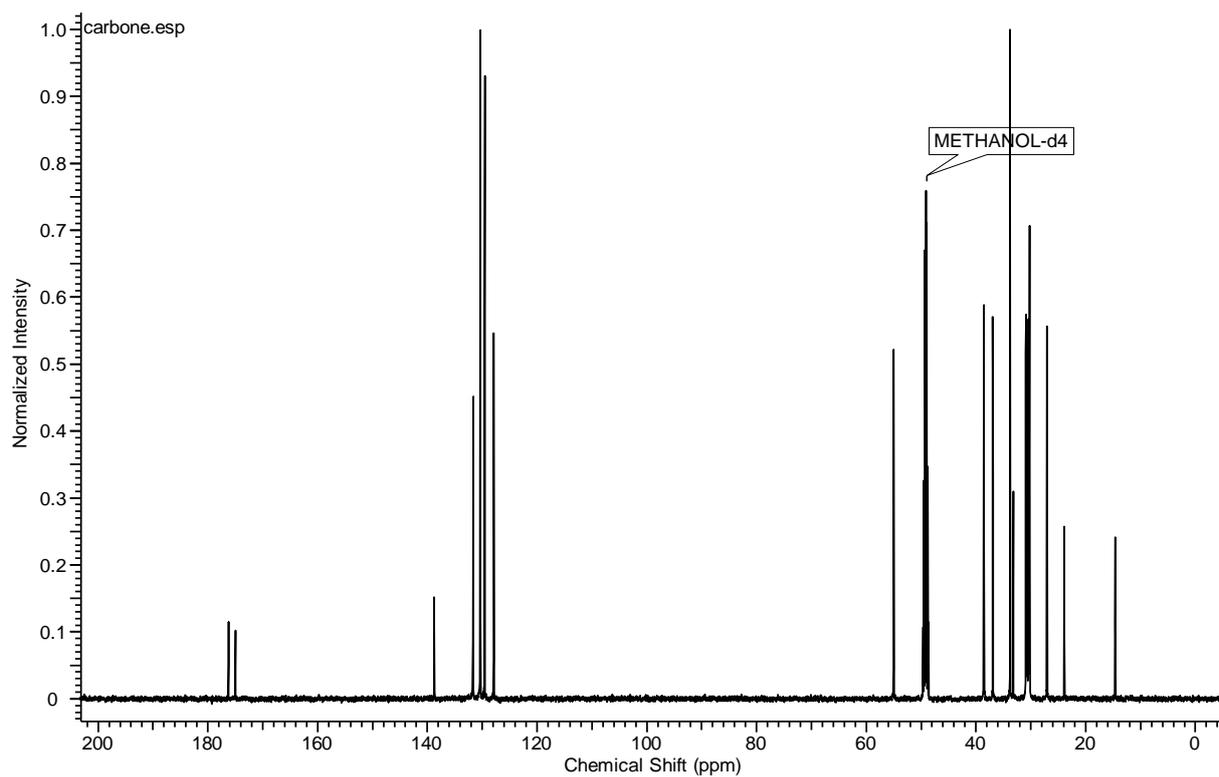


Figure S92. ^{13}C NMR spectrum for compound **28** in CD_3OD

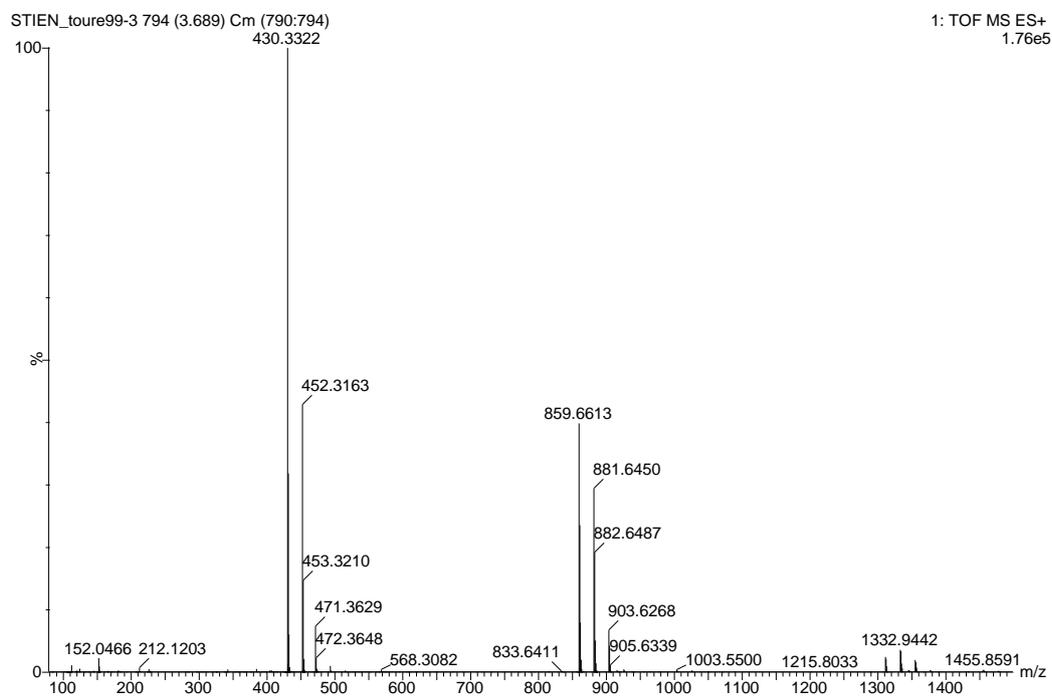


Figure S93. HRMS of compound **28** in MeOH

Spectroscopic data of compound 29

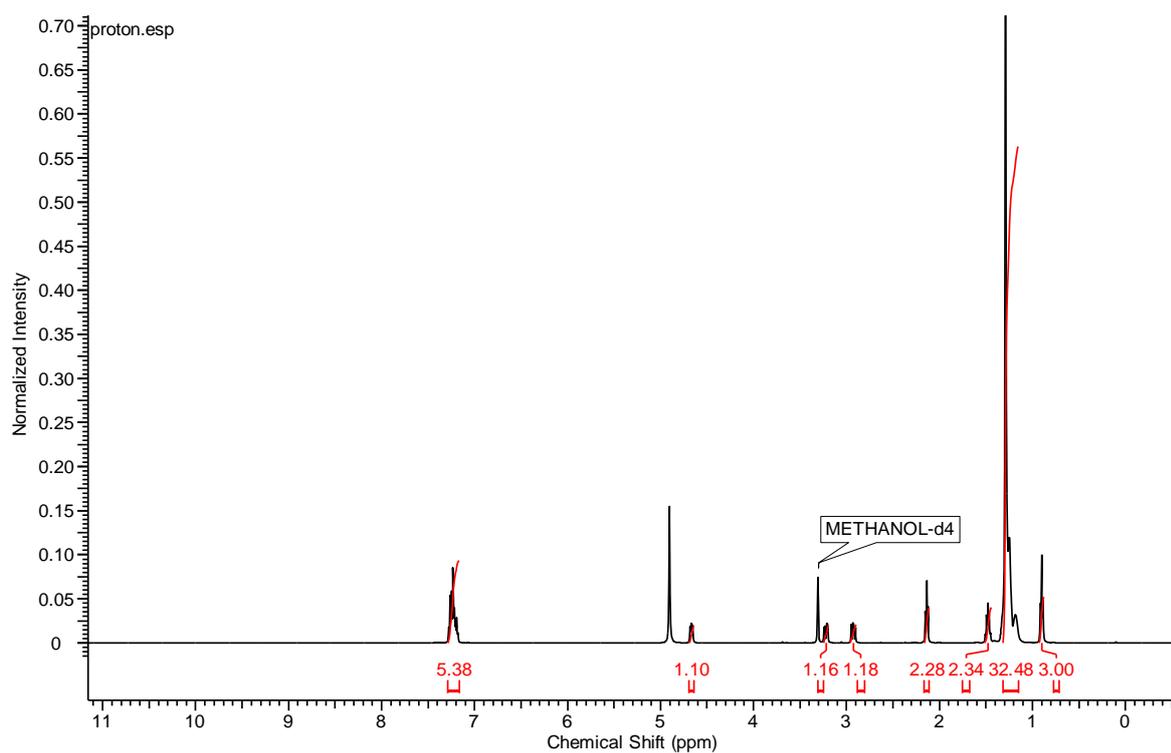


Figure S94. ^1H NMR spectrum for compound **29** in CD_3OD

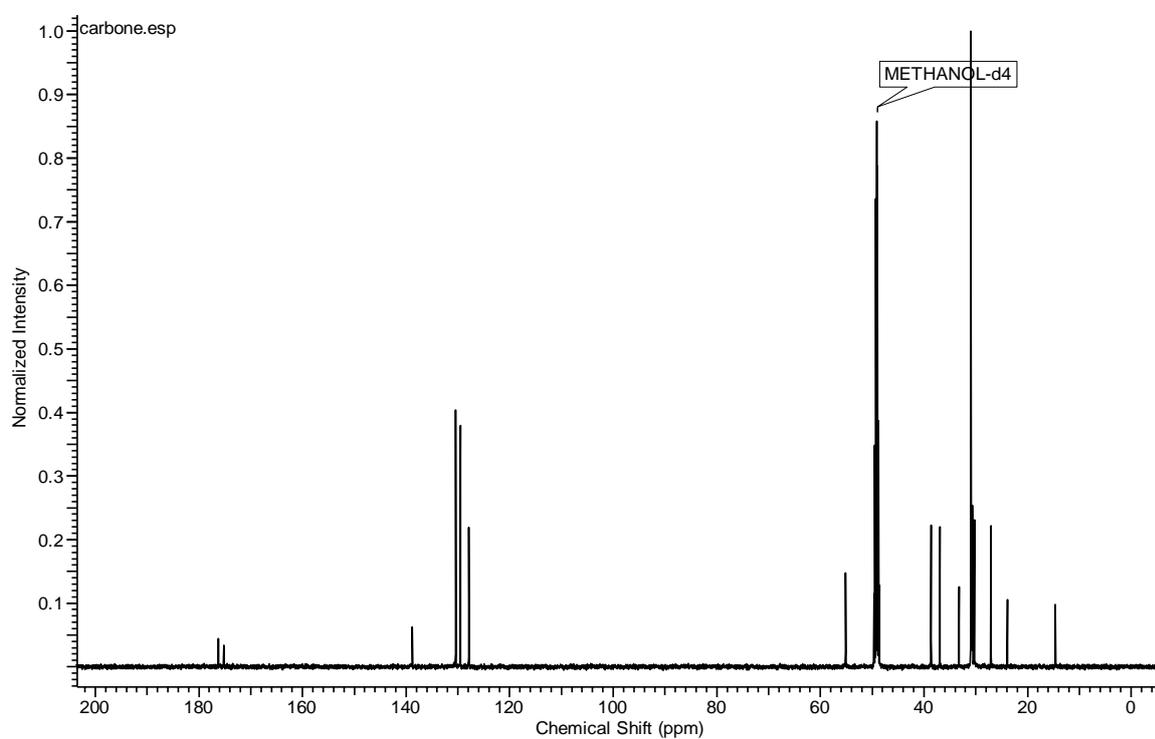


Figure S95. ^{13}C NMR spectrum for compound **29** in CD_3OD

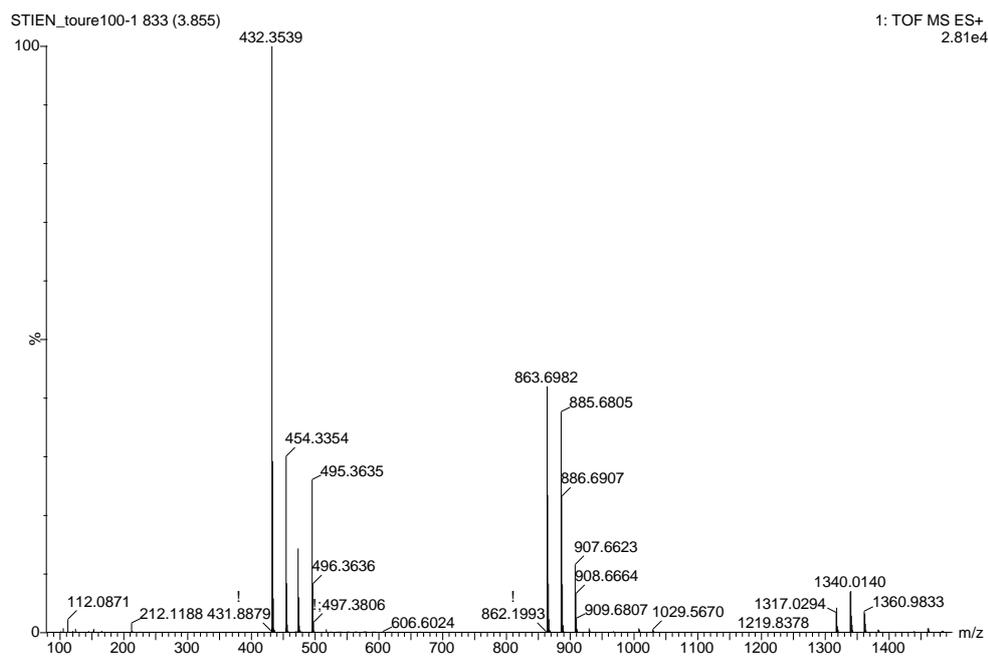


Figure S96. HRMS of compound **29** in MeOH

Spectroscopic data of compound **30**

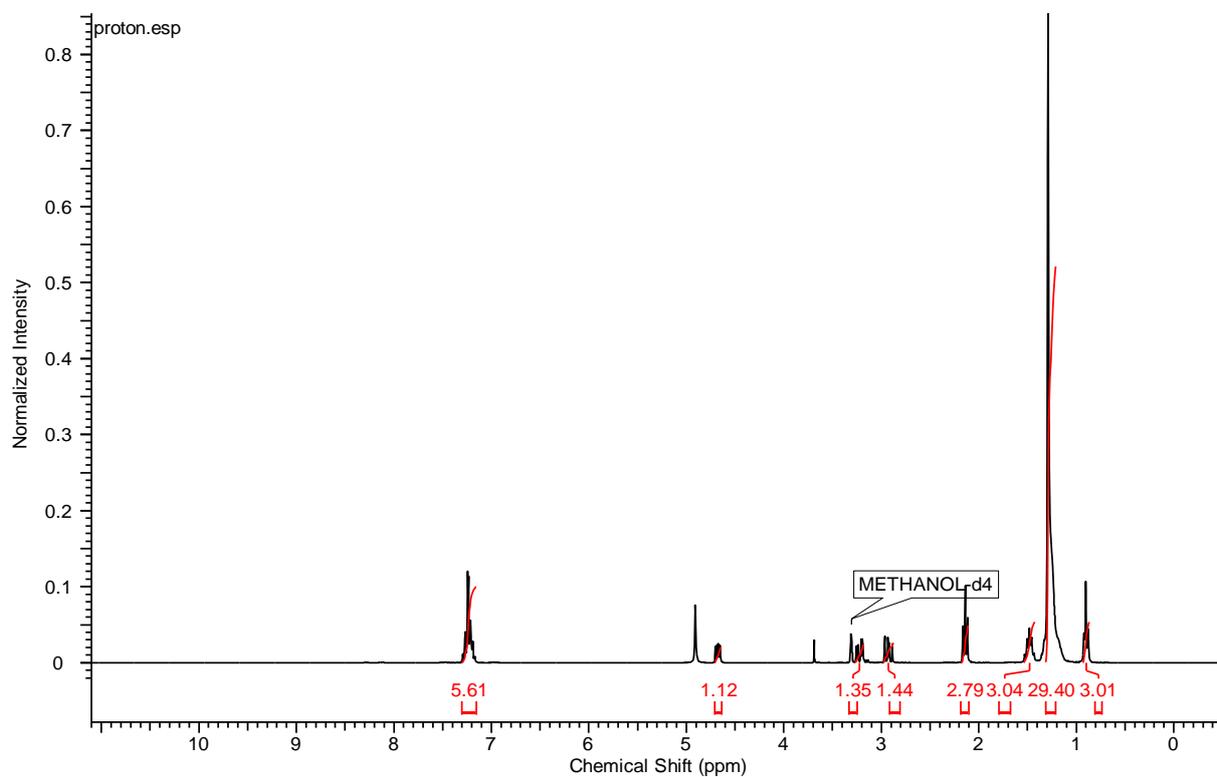


Figure S97. ^1H NMR spectrum for compound **30** in CD_3OD

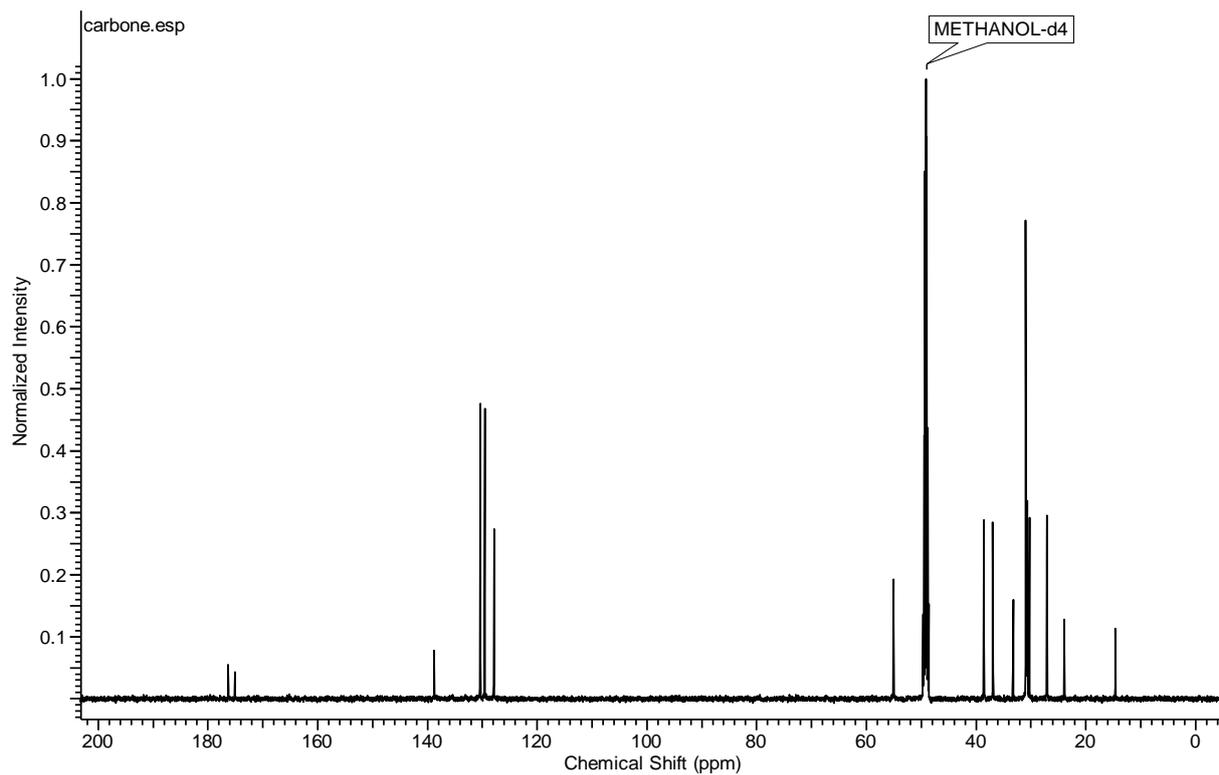


Figure S98. ^{13}C NMR spectrum for compound **30** in CD_3OD

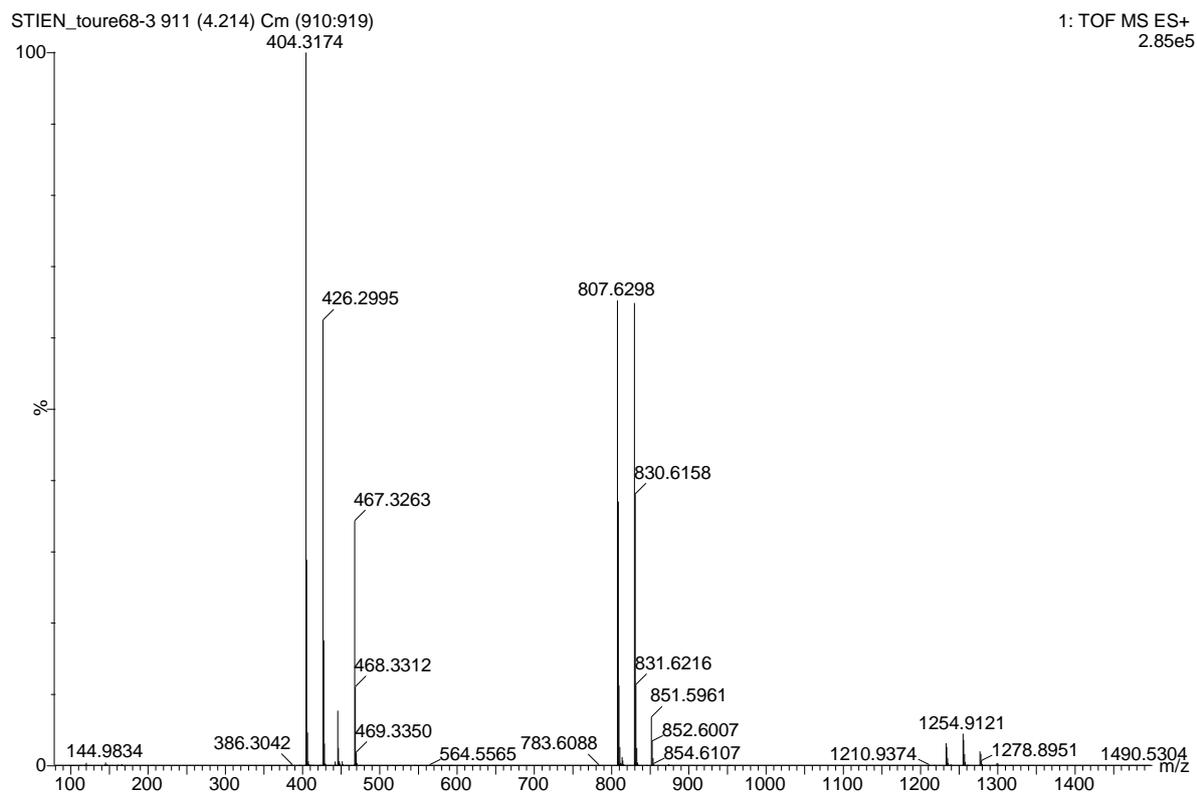


Figure S99. HRMS of compound **30** in MeOH

Spectroscopic data of compound **31**

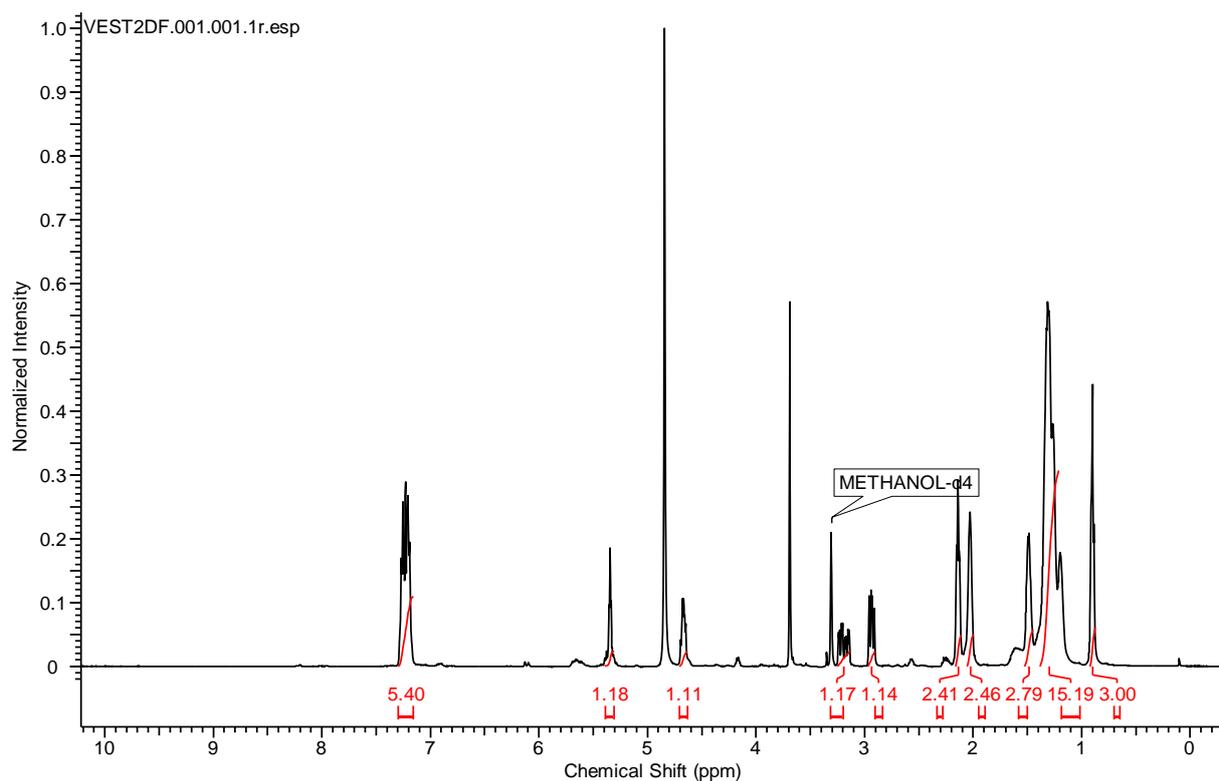


Figure S100. ^1H NMR spectrum for compound **31** in CD_3OD

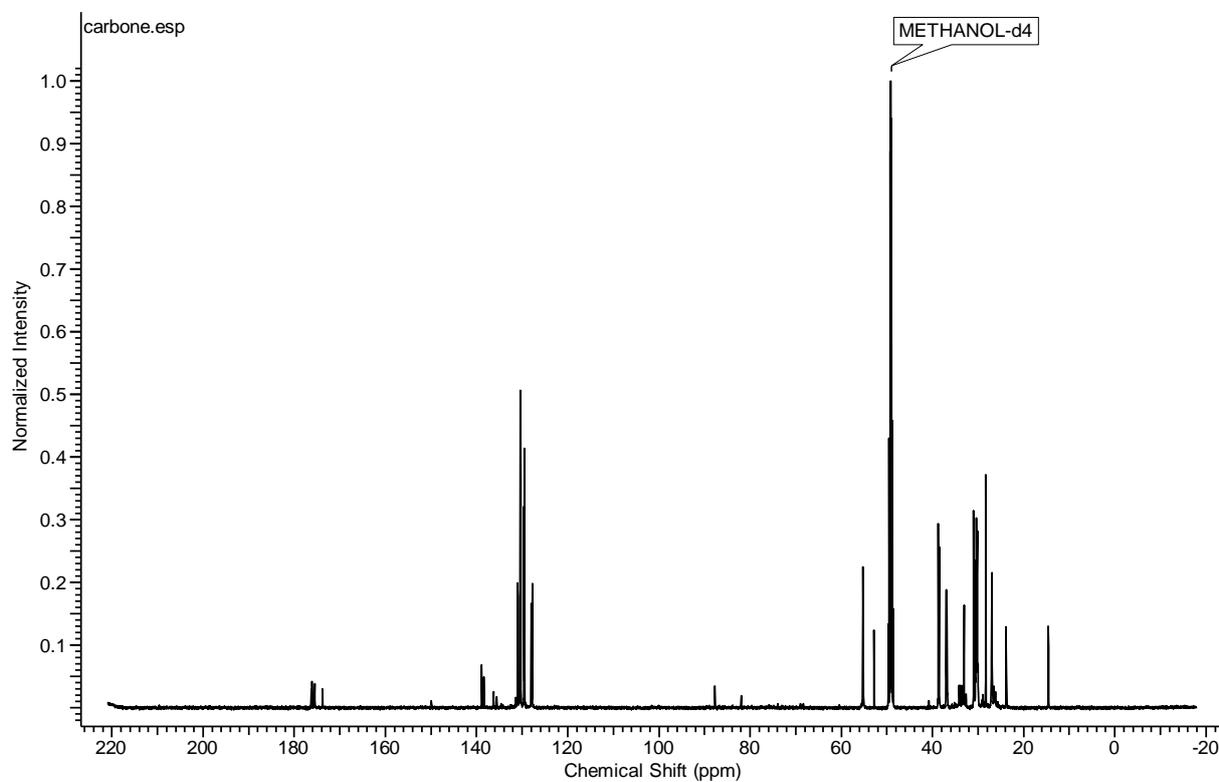


Figure S101. ^{13}C NMR spectrum for compound **31** in CD_3OD

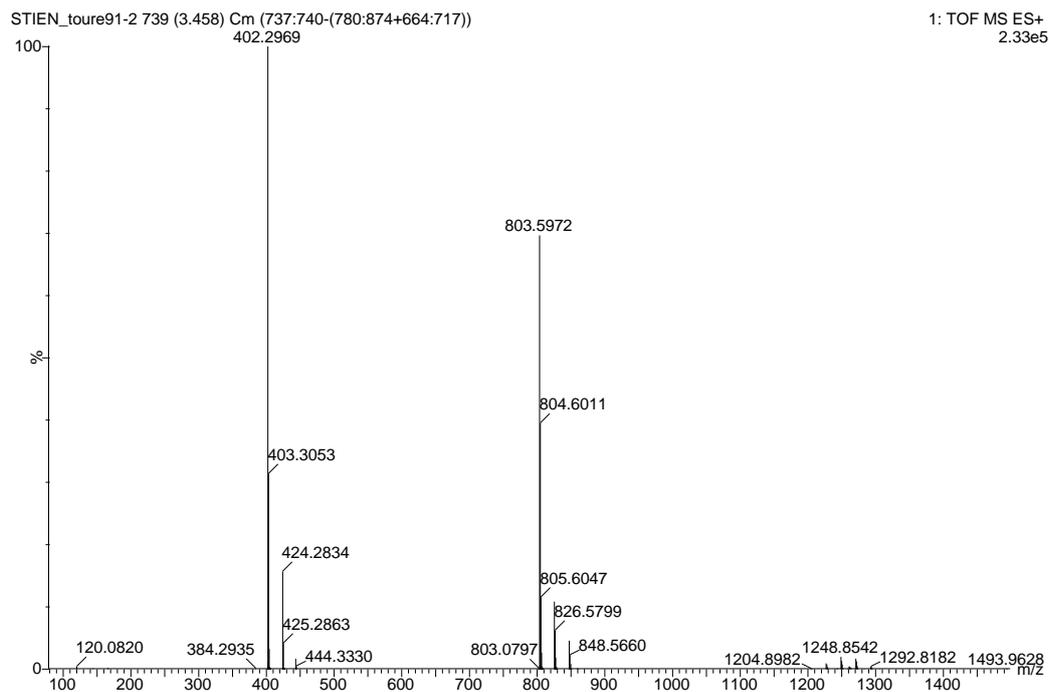


Figure S102. HRMS of compound **31** in MeOH

Spectroscopic data of compound **32**

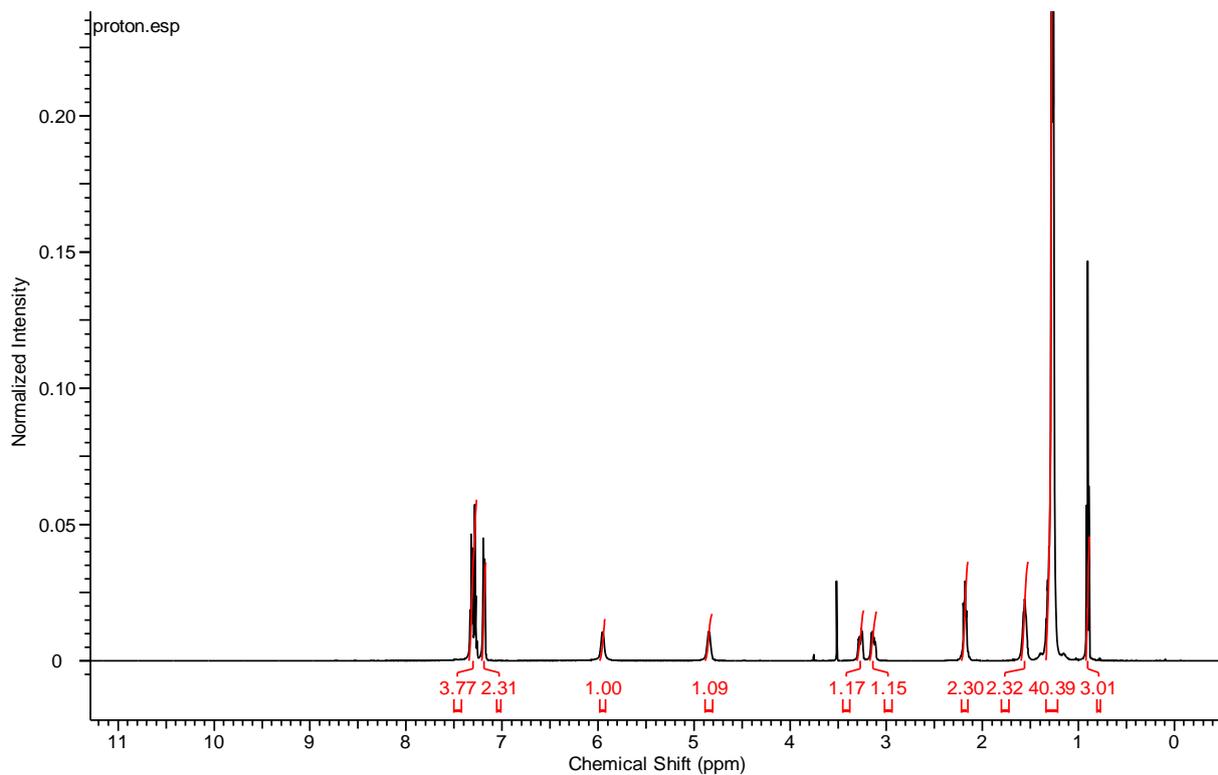


Figure S103. ^1H NMR spectrum for compound **32** in CD_3OD

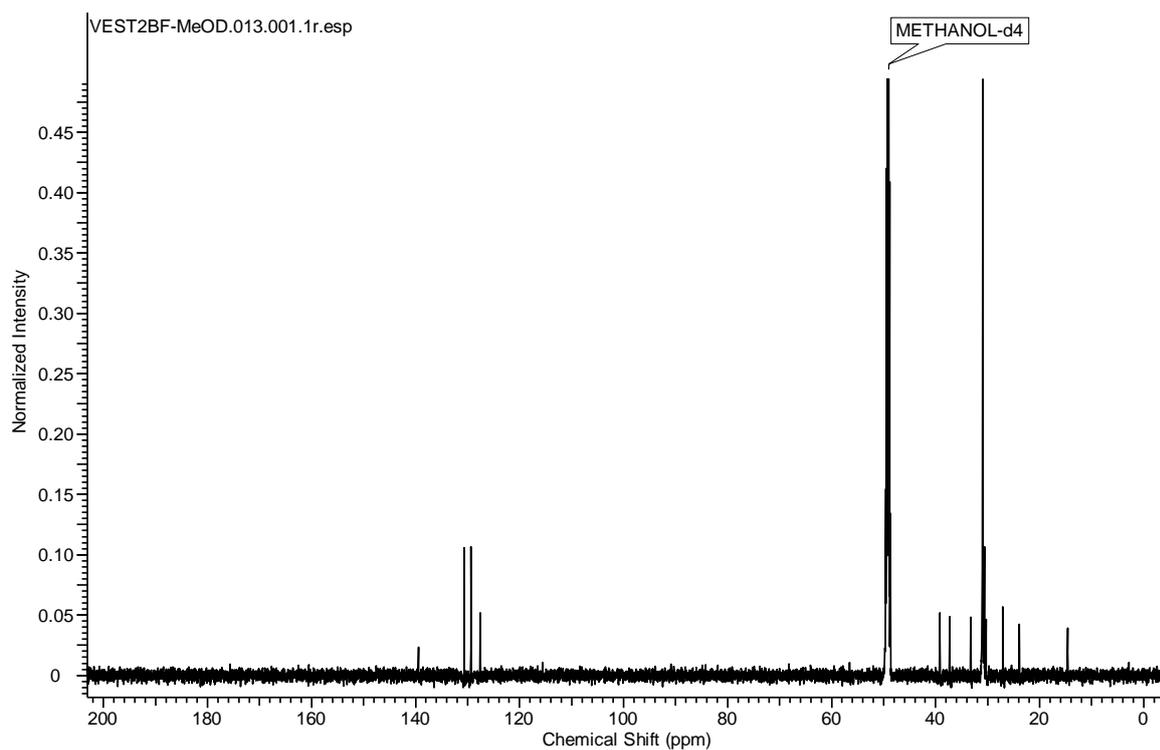


Figure S104. ^{13}C NMR spectrum for compound **32** in CD_3OD

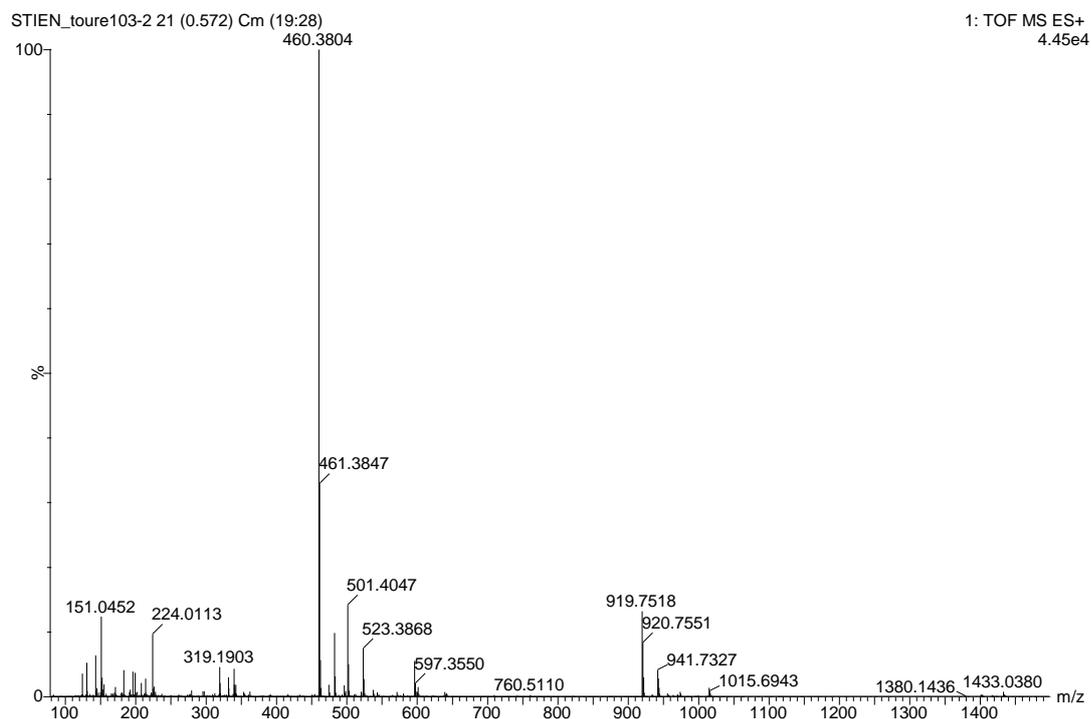


Figure S105. HRMS of compound **32** in MeOH

Spectroscopic data of compound **33**

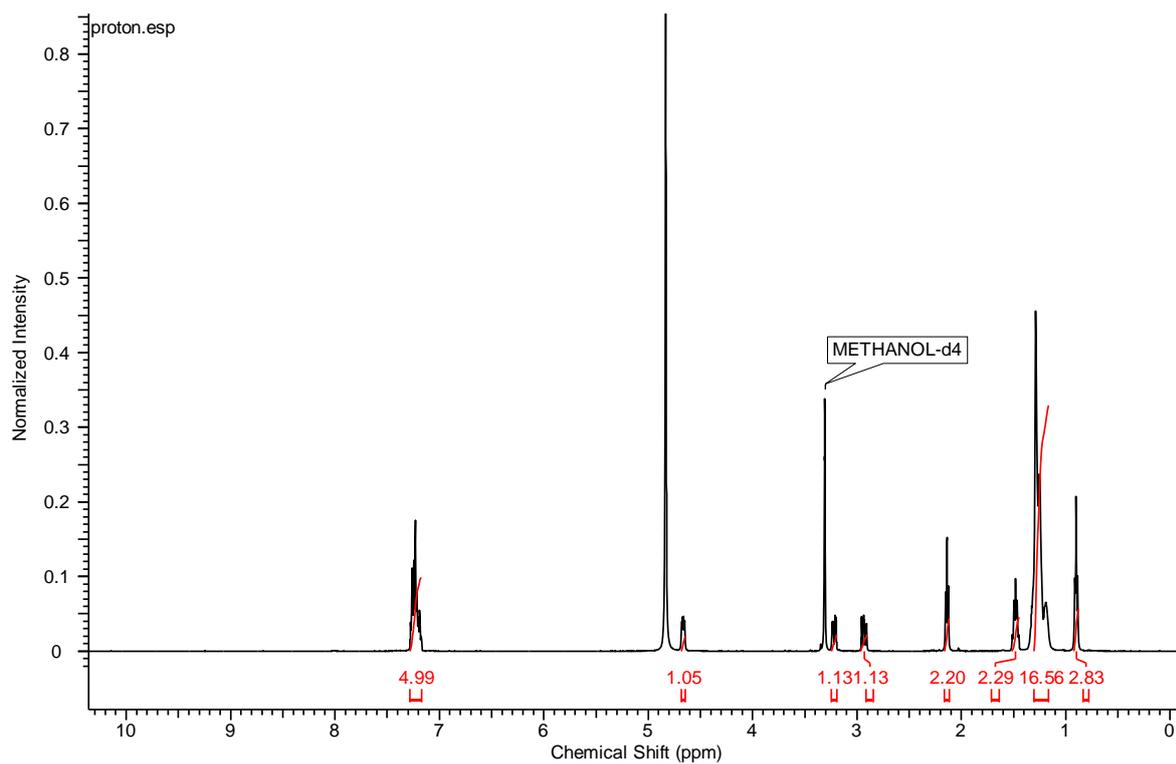


Figure S106. ^1H NMR spectrum for compound **33** in CD_3OD

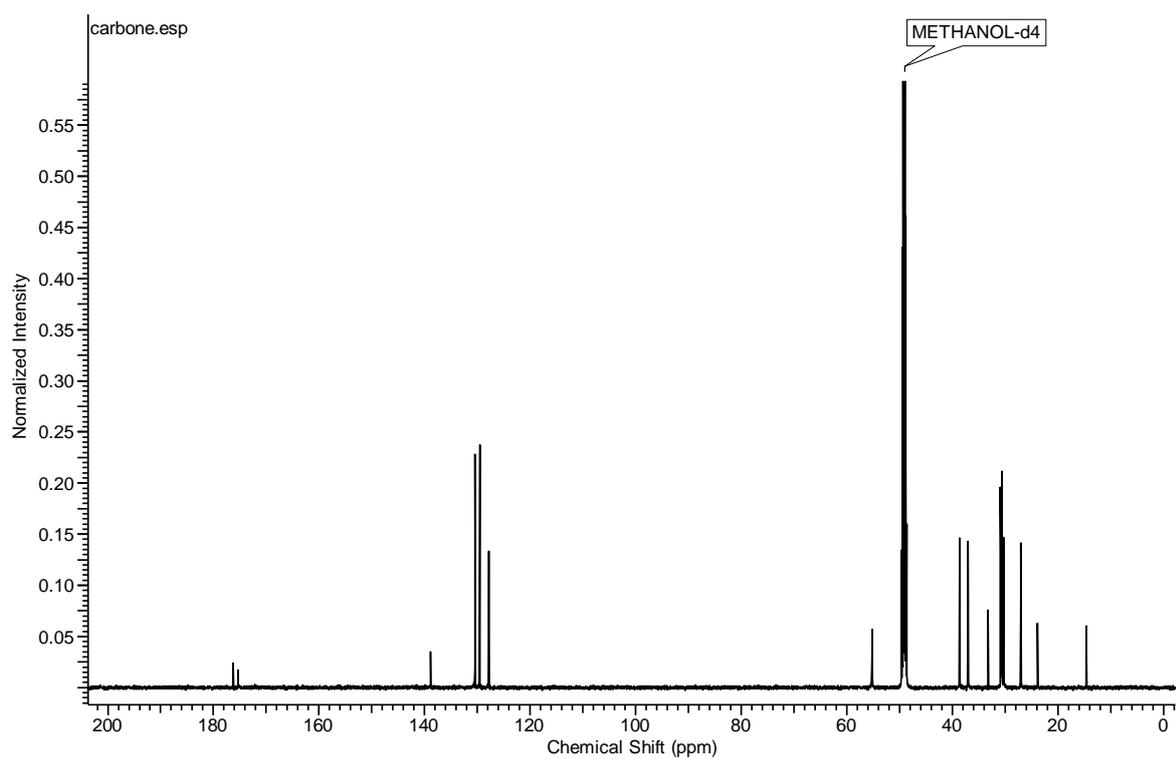


Figure S107. ^{13}C NMR spectrum for compound **33** in CD_3OD

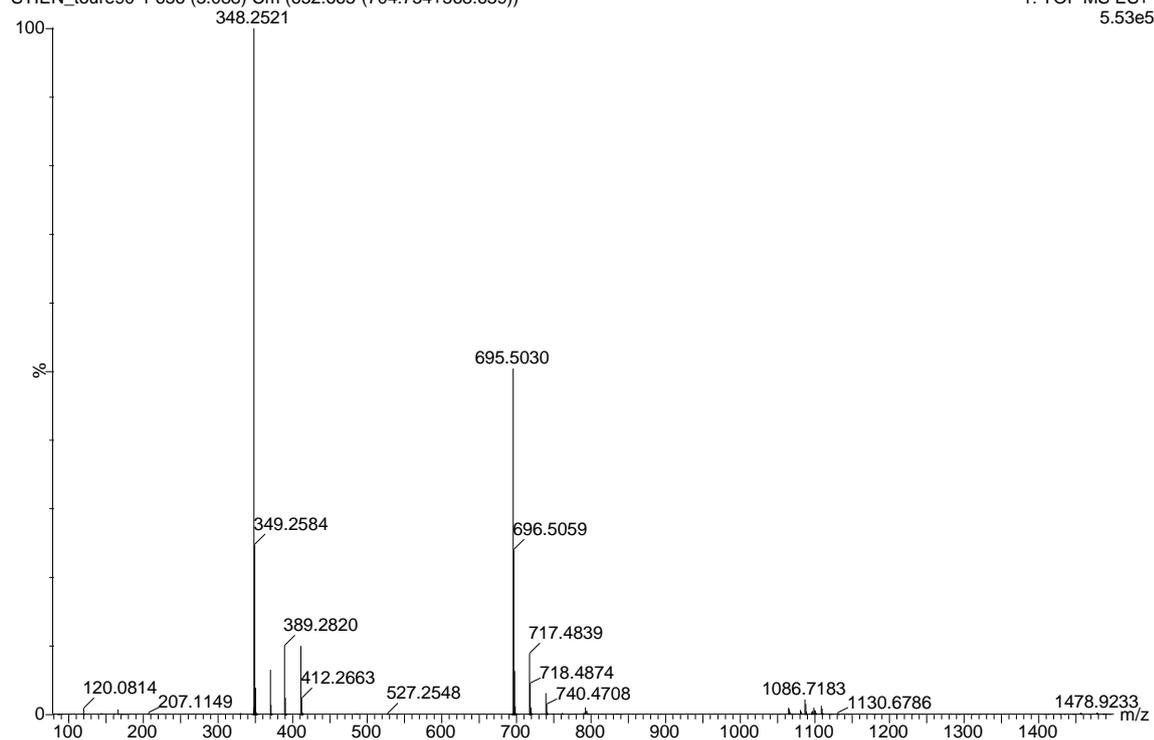


Figure S108. HRMS of compound **33** in MeOH

Spectroscopic data of compound 34

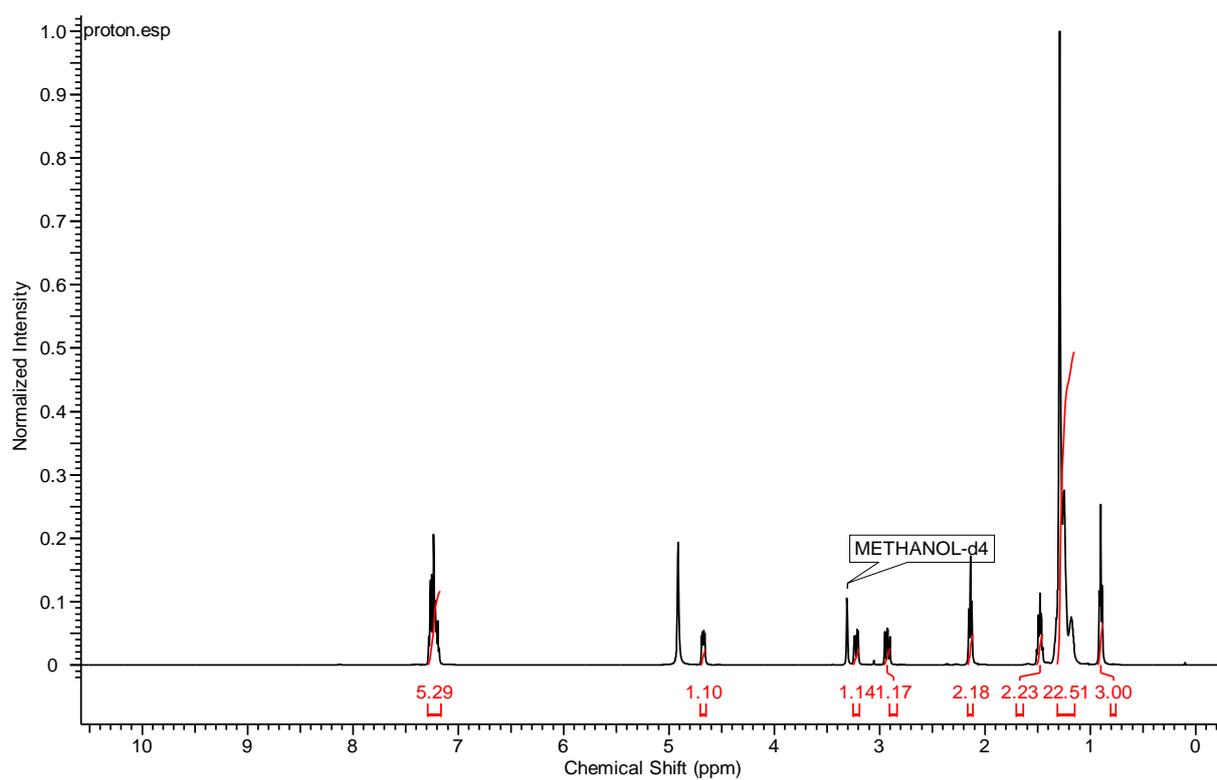


Figure S109. ^1H NMR spectrum for compound **34** in CD_3OD

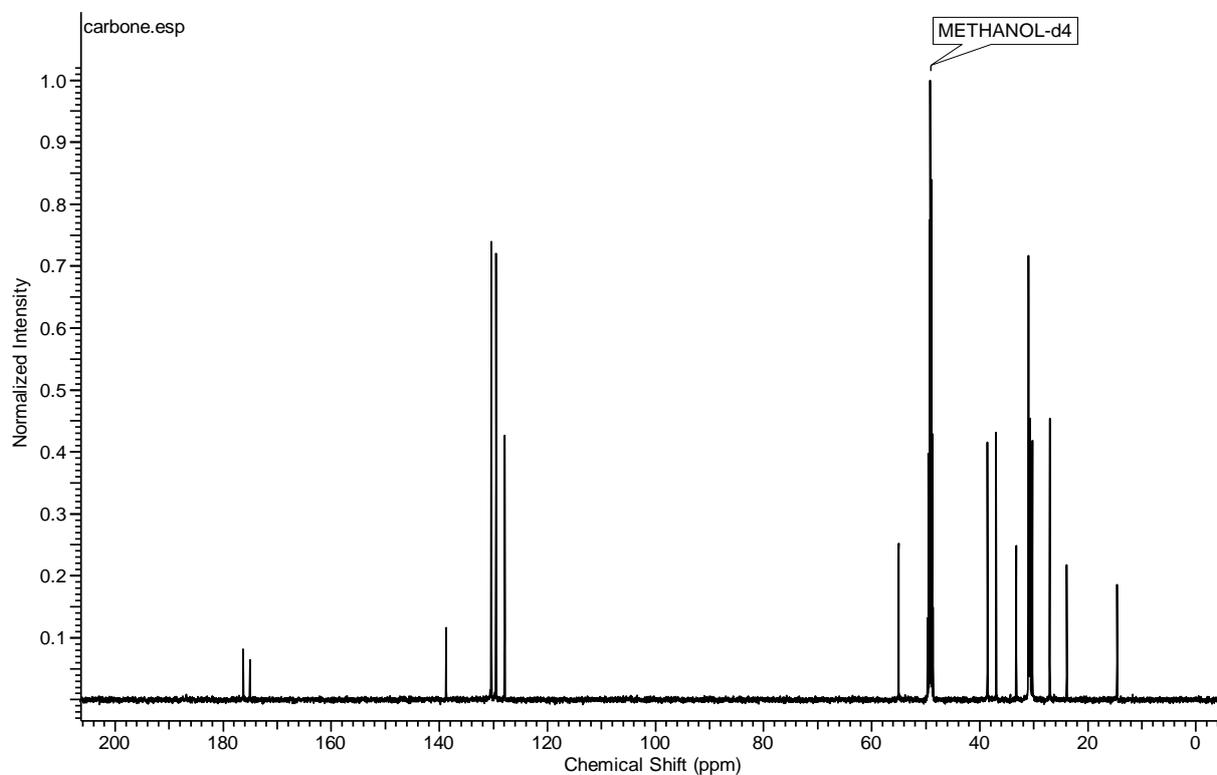


Figure S110. ^{13}C NMR spectrum for compound **34** in CD_3OD

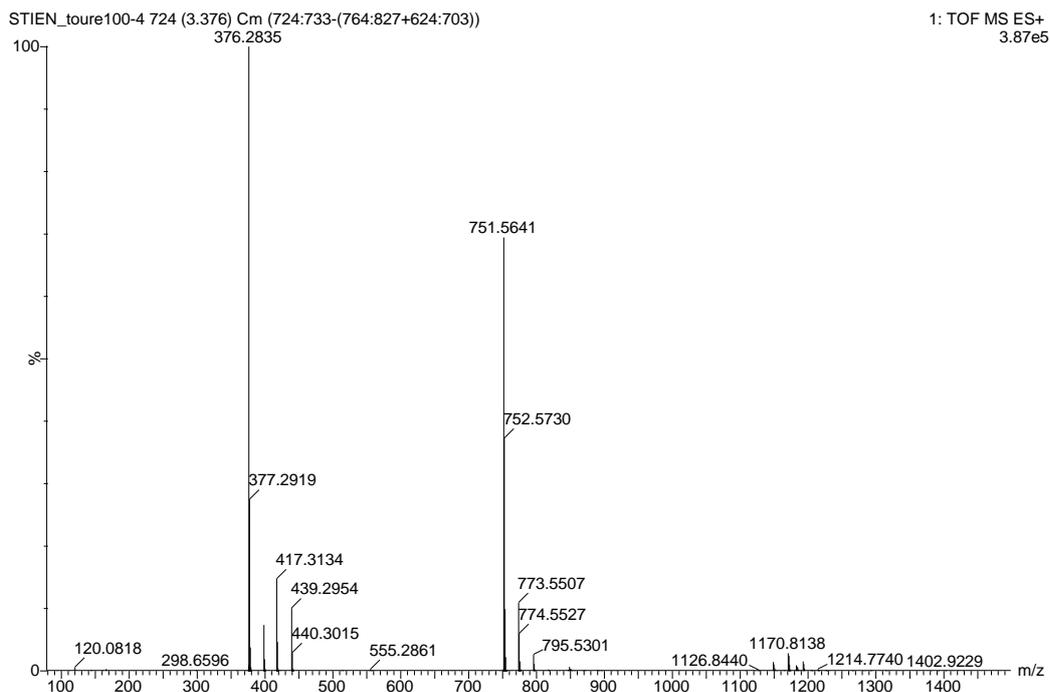


Figure S111. HRMS of compound **34** in MeOH

Spectroscopic data of compound **35**

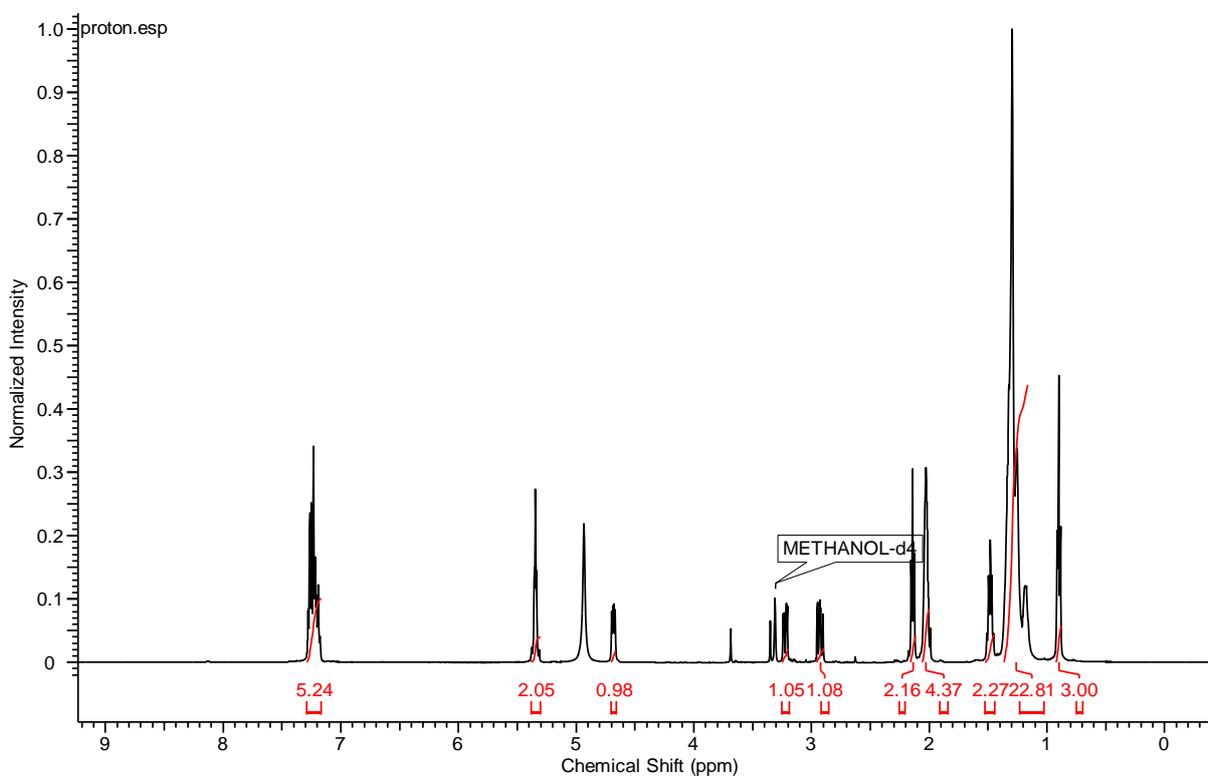


Figure S112. ^1H NMR spectrum for compound **35** in CD_3OD

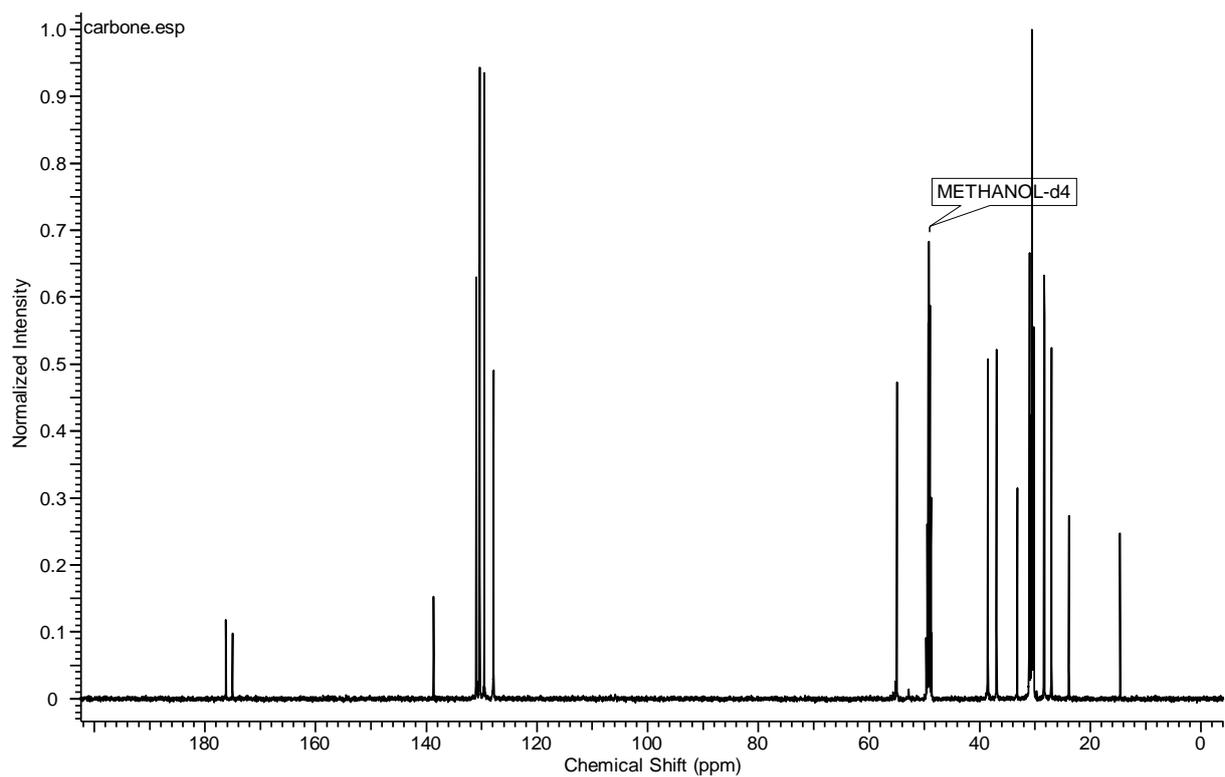


Figure S113. ^{13}C NMR spectrum for compound **35** in CD_3OD

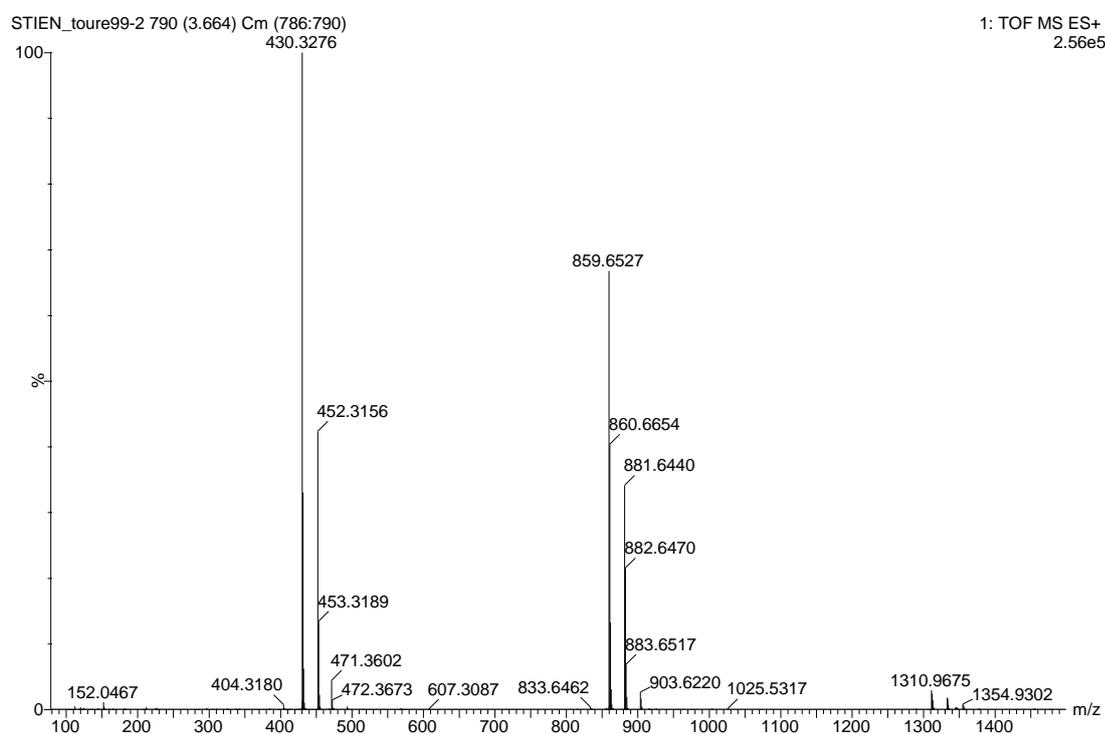


Figure S114. HRMS of compound **35** in MeOH

Spectroscopic data of compound 36

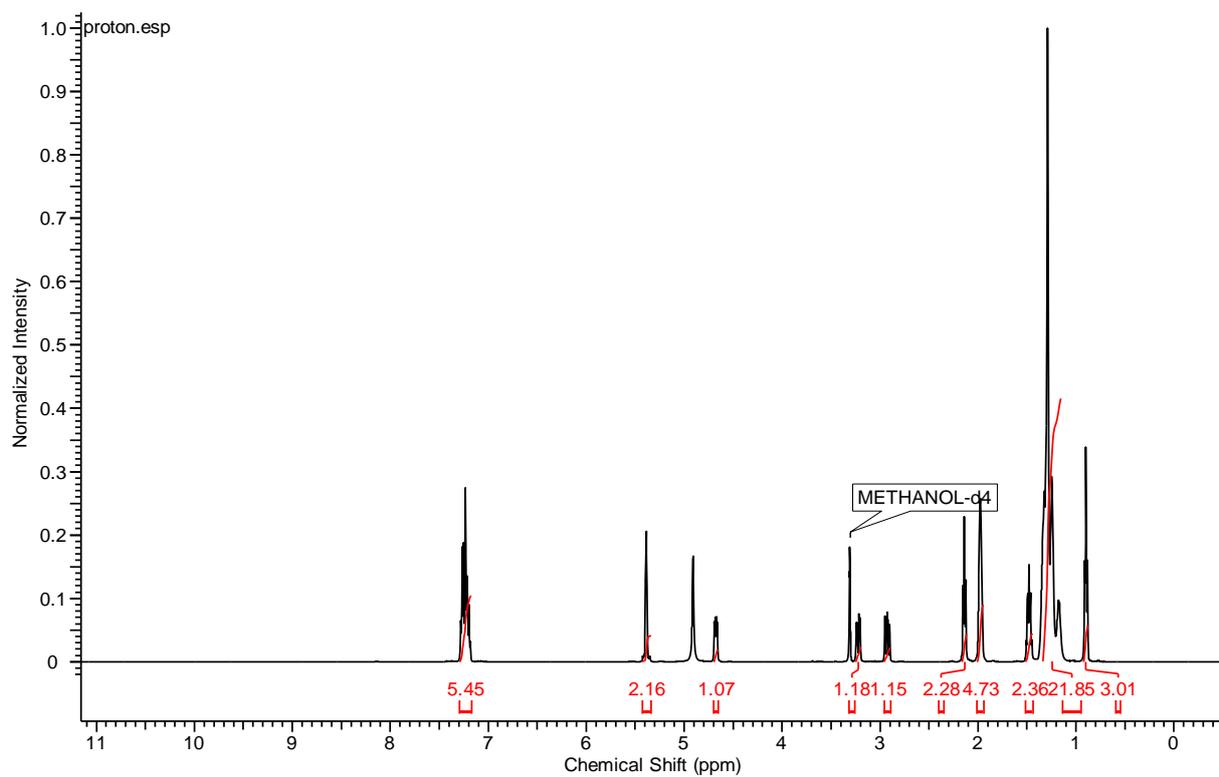


Figure S115. ^1H NMR spectrum for compound 36 in CD_3OD

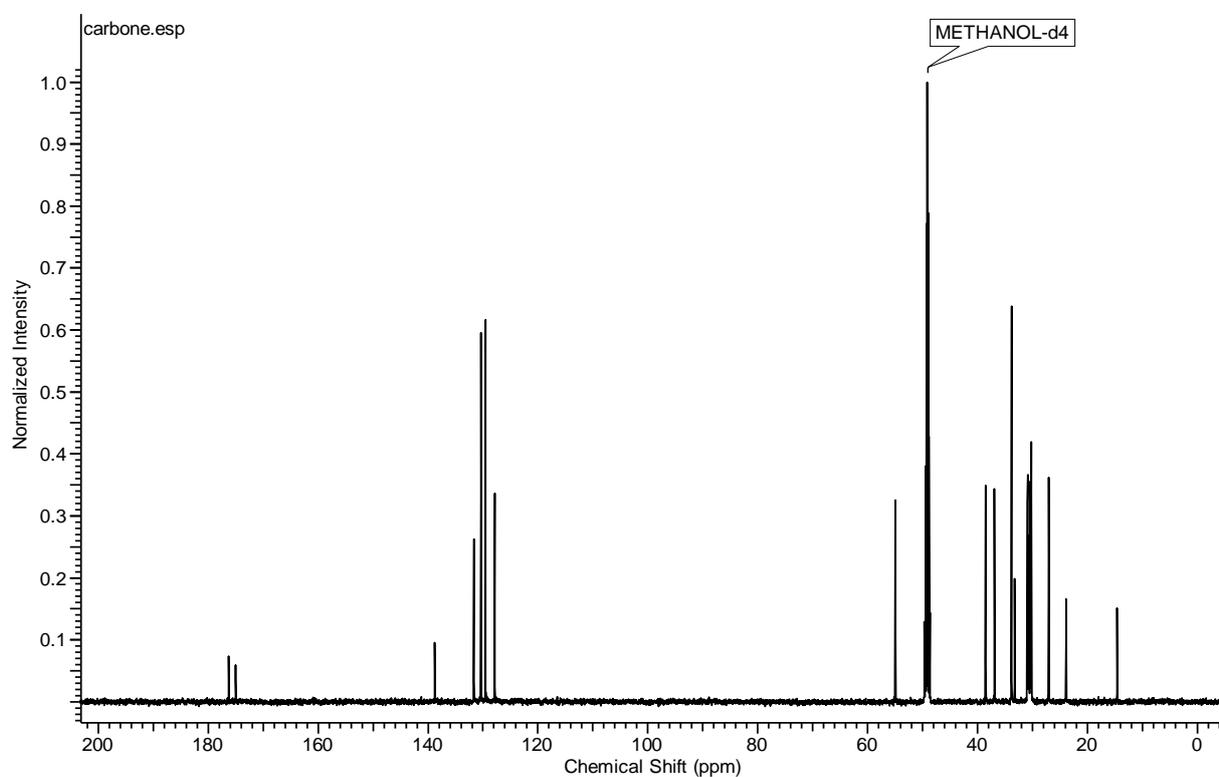


Figure S116. ^{13}C NMR spectrum for compound 36 in CD_3OD

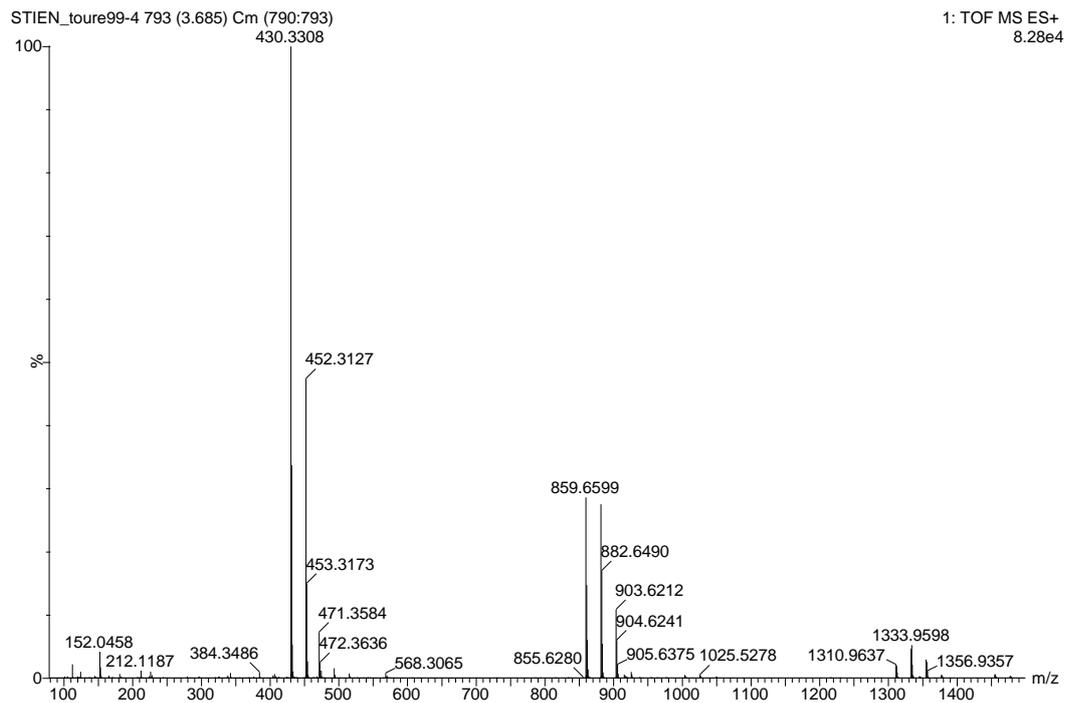


Figure S117. HRMS of compound **36** in MeOH

Spectroscopic data of compound **37**

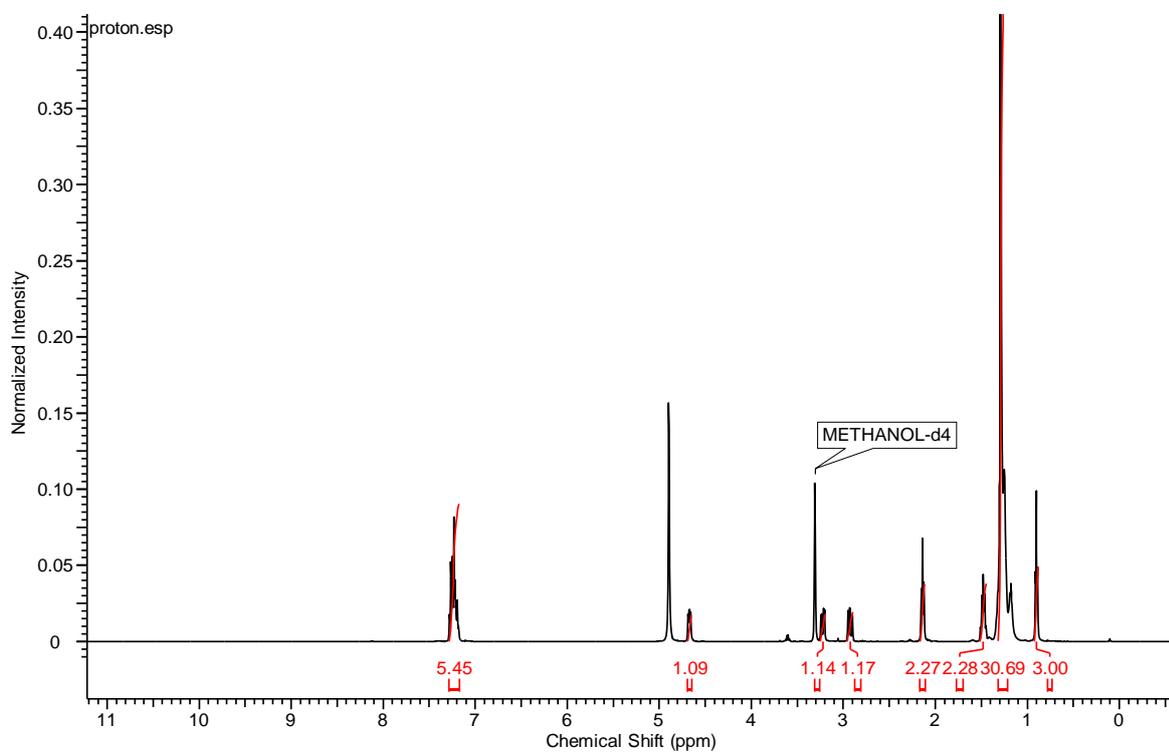


Figure S118. ^1H NMR spectrum for compound **37** in CD_3OD

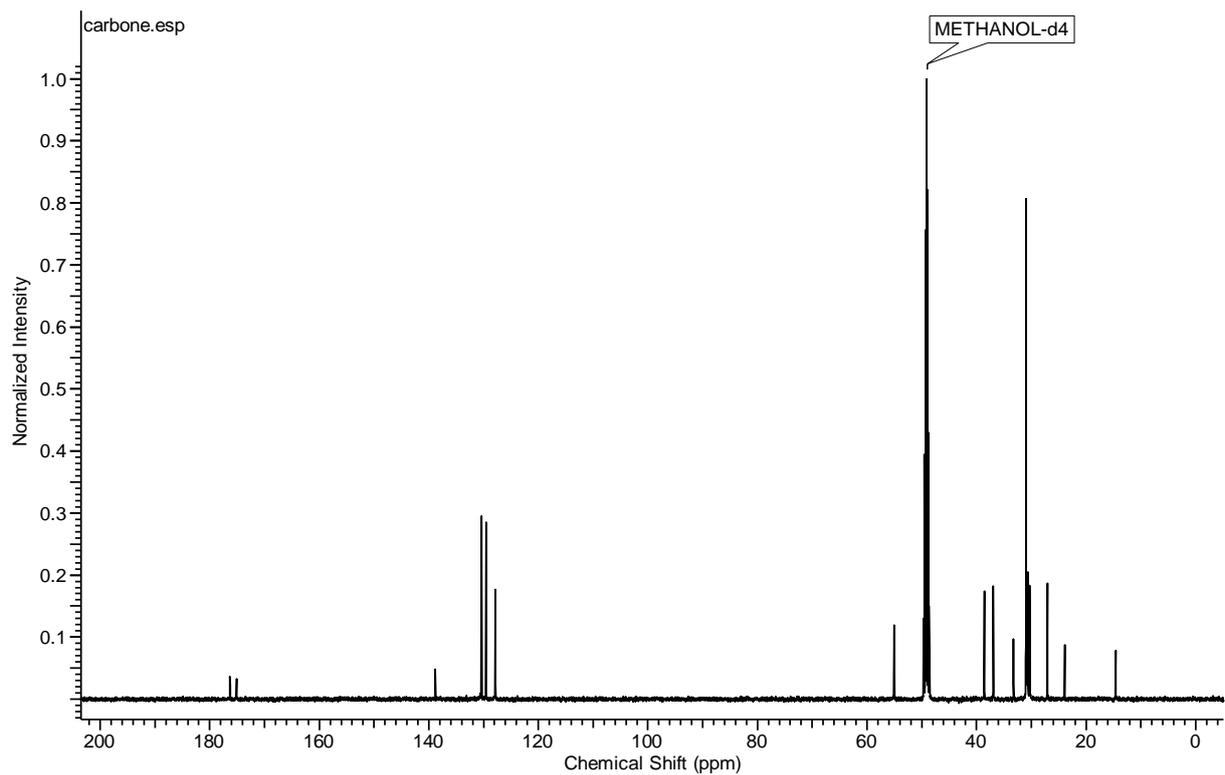


Figure S119. ^{13}C NMR spectrum for compound **37** in CD_3OD

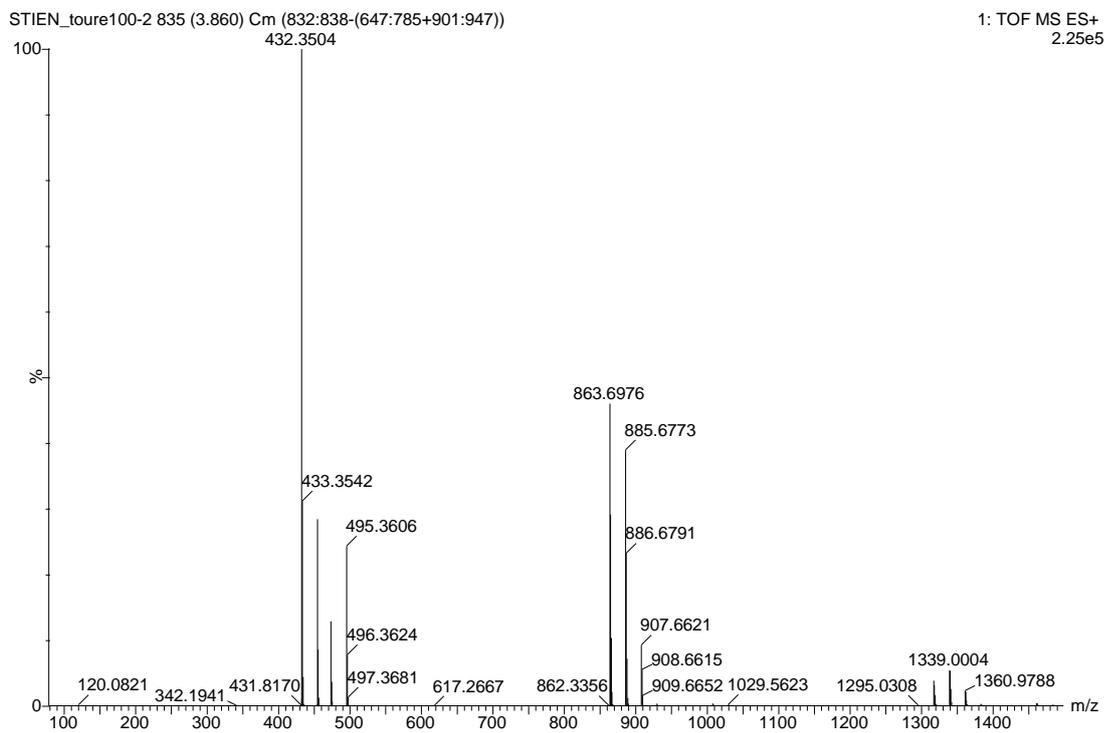


Figure S120. HRMS of compound **37** in MeOH

Spectroscopic data of compound 38

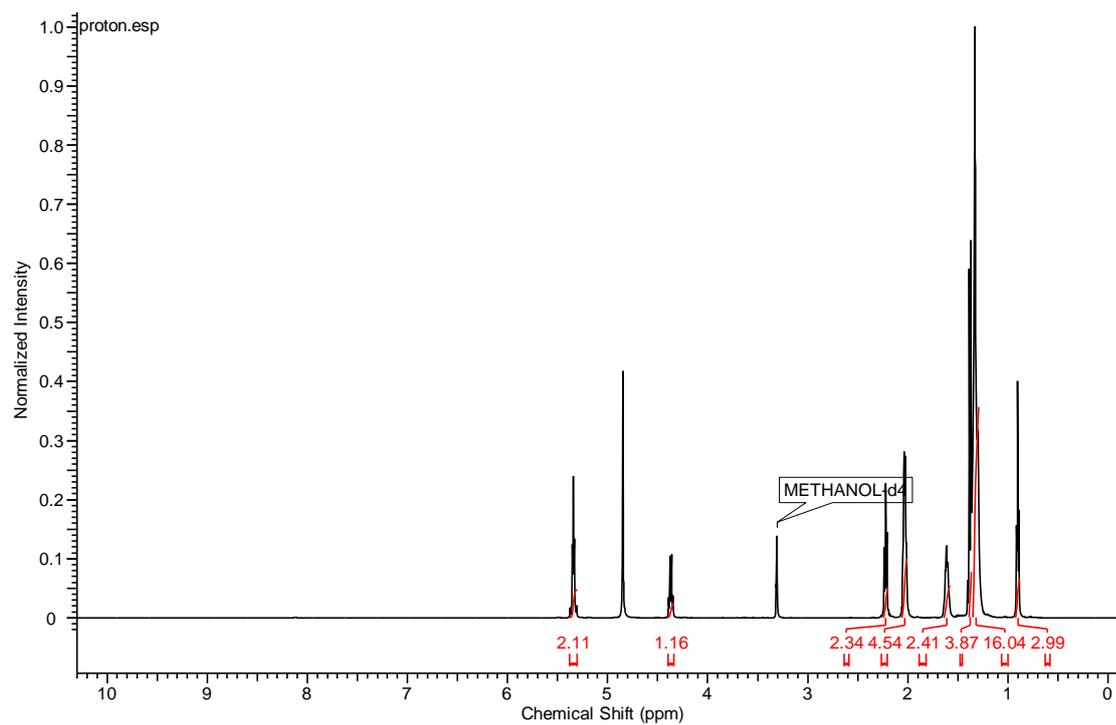


Figure S121. ^1H NMR spectrum for compound **38** in CD_3OD

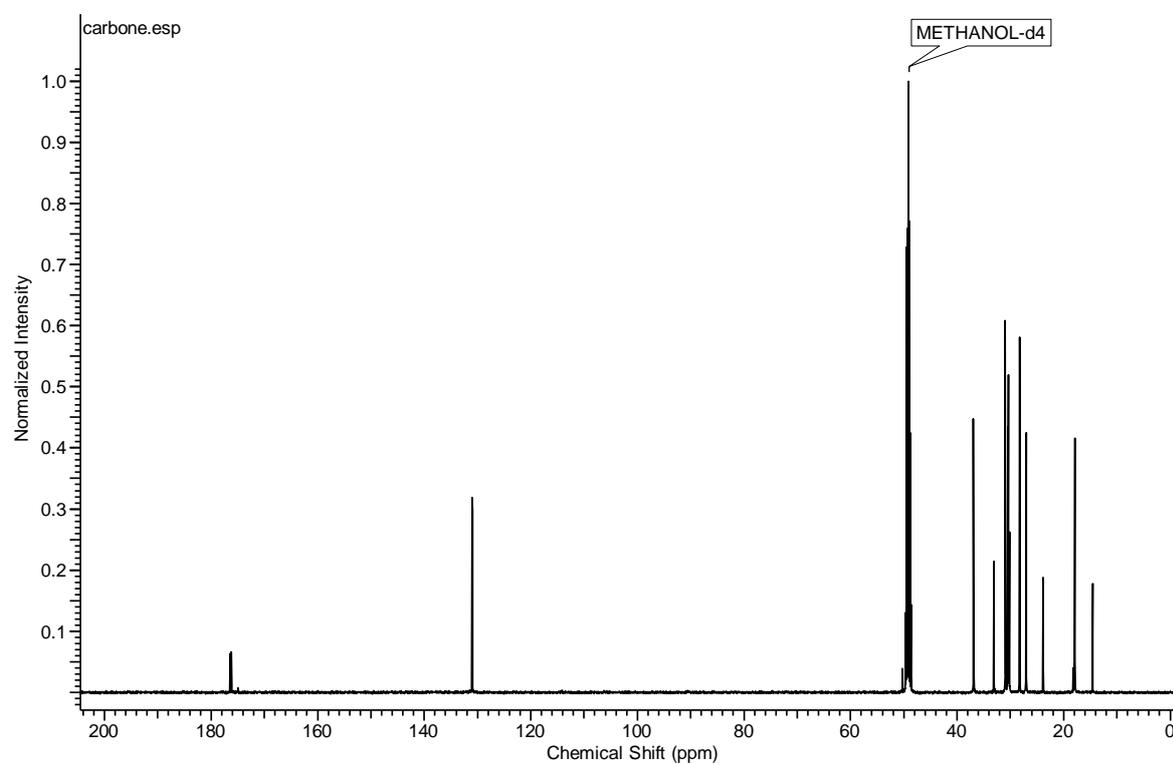


Figure S122. ^{13}C NMR spectrum for compound **38** in CD_3OD

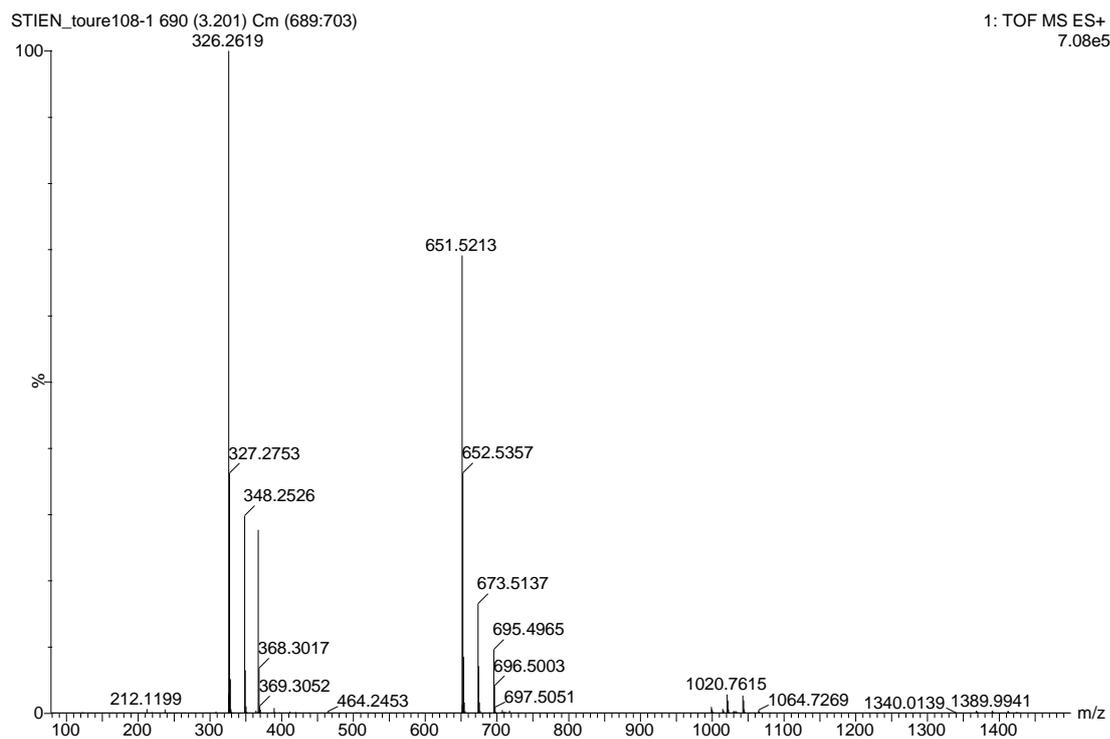


Figure S123. HRMS of compound **38** in MeOH

Spectroscopic data of compound **39**

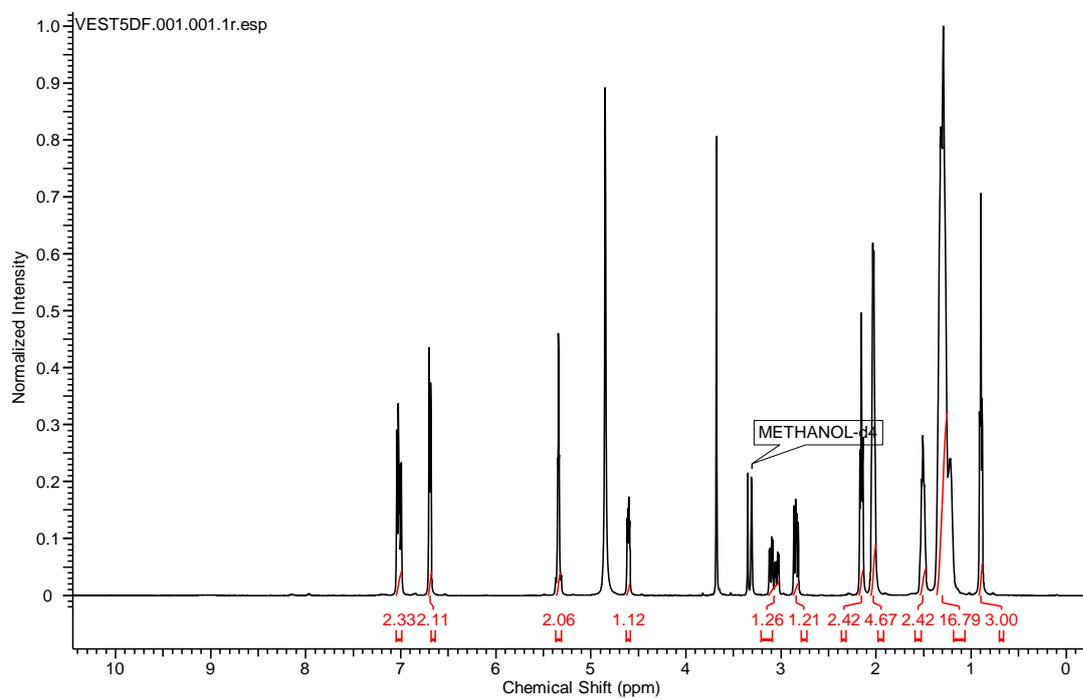


Figure S124. ¹H NMR spectrum for compound **39** in CD₃OD

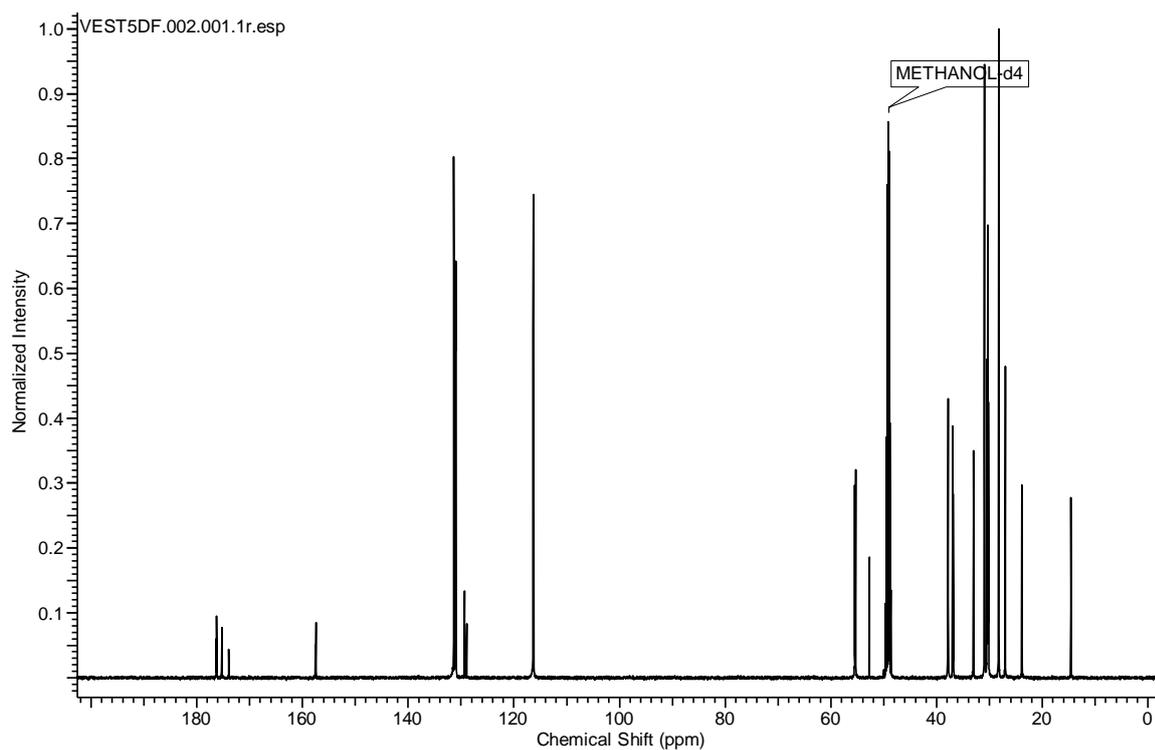


Figure S125. ^{13}C NMR spectrum for compound **39** in CD_3OD

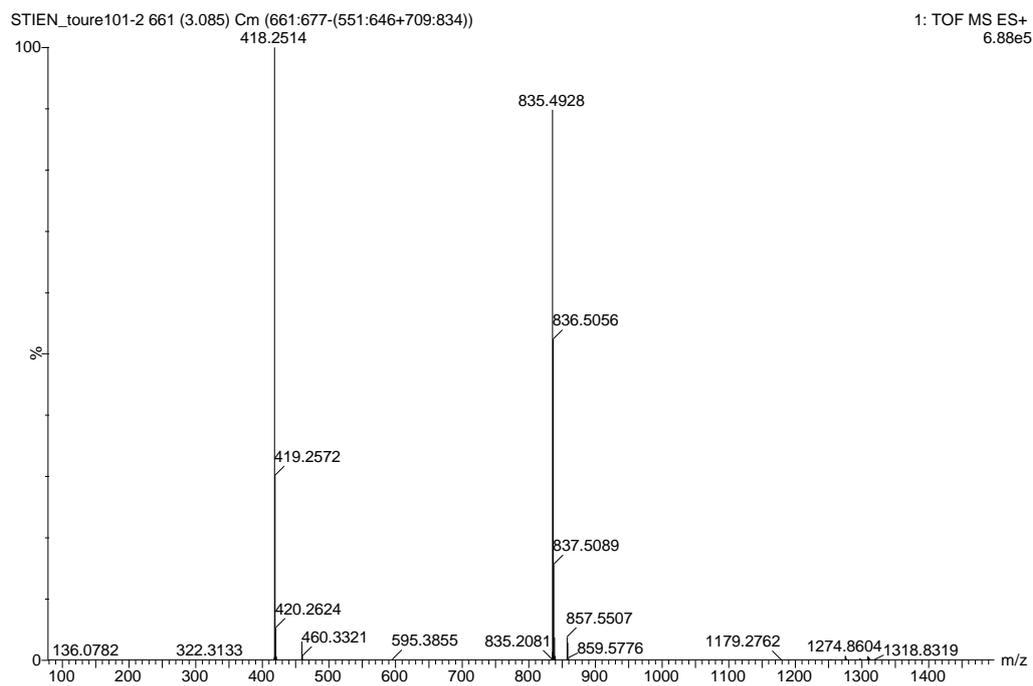


Figure S126. HRMS of compound **39** in MeOH

Complément à l'article 4

Les configurations absolues des composés **1** et **2** de cet article n'ont pas pu être déterminées.

Au vu des faibles quantités isolées, nous n'avons pas envisagé la synthèse des esters de Mosher. En revanche une méthode CCM permettant de déterminer la configuration absolue d'alcools secondaires a été tentée au laboratoire.²⁴¹ Son principe est basé sur une conversion énantiosélective compétitive (Competing Enantioselective Conversion, CEC). La méthode permet de suivre l'avancée de deux réactions en parallèle impliquant chacun des énantiomères de l'homobenzotetramizole (HBTM) utilisé pour la conversion cinétique. La vitesse des deux réactions est suivie, et les vitesses relatives permettent d'établir la configuration absolue de l'alcool.

Bien que cette méthode ne nécessite que de faible quantité de produits, les essais au laboratoire n'ont pas permis de déterminer la configuration des alcools secondaires. En effet, nous n'avons pas pu détecter et observer la migration des composés sur la plaque CCM.

Résultats complémentaires

L'étude de la souche bactérienne *Pantoea* SNB-VECD14B, nous a permis d'isoler des dicétopipérazines (DKP). Ces molécules ont été obtenues sous la forme d'une suspension blanche à partir de la fraction II suite à la chromatographie flash.

L'identification structurale de ces composés a été effectuée par comparaison avec les données de RMN ¹H et de HRMS de la littérature. Ainsi nous avons pu isoler et identifier la cyclo(L-Tyr-L-Leu), la cyclo(L-Tyr-L-Phe) et la cyclo(L-Arg-L-Leu) présentées **Figure 48**. Les données spectrales relatives à ces composés sont disponibles en annexe.

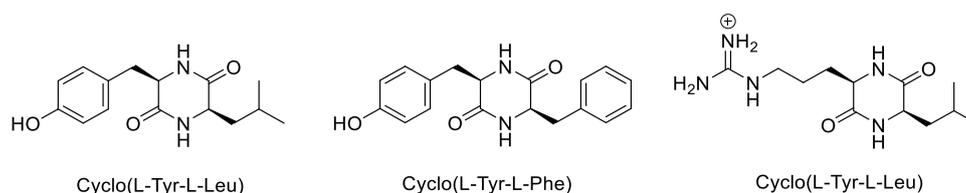


Figure 48 : Dicétopipérazines isolées de la bactérie *Pantoea* SNB-VECD14B

²⁴¹ Wagner AJ, Rychnovsky SD. Determination of absolute configuration of secondary alcohols using thin-layer chromatography. *J Org Chem.* 2013; 78:4594–4598.

L'étude de la fraction V a permis l'isolement d'hydroxy-acylphenylalanines mais également d'un composé soufré très minoritaire dans l'extrait : la 2,2'-sulfonyldinaphthalène. Ce composé a été isolé en très faible quantité (0,4 mg) sous la forme d'un résidu blanc. L'analyse HRESITOFMS présentait un pic d'ion moléculaire à 319.0784 (calculé pour $[M+H]^+$ $C_{20}H_{15}O_2S$, à m/z 319.0787) correspondant à la formule $C_{20}H_{14}O_2S$.

L'analyse du spectre proton de ce composé a mis en évidence 7 signaux correspondant à des protons aromatiques à δ_H 8.68, 8.10, 8.04, 7.95, 7.92, 7.67 et 7.66. L'analyse des spectres 2D a permis de constituer un groupement naphthalényle substitué en position 2 (**Figure 49**). Pour satisfaire la formule brute, nous avons déduit une symétrie dans la structure du composé et la présence d'un atome de soufre.

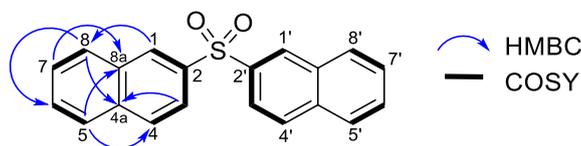


Figure 49 : Corrélations COSY et HMBC clés du 2,2'-sulfonyldinaphthalène

Tableau 7 : Données RMN 1D et 2D de la 2,2'-sulfonyldi-naphthalene

Position	δ_C , type ^a	δ_H , m (J en Hz) ^b	COSY	HMBC
1	130.2, CH	8.68, d (1.9)	H1, H6	C4, C6, C10
2	139.8, C			
3	123.6, CH	7.92, dd (8.8, 1.9)	H5, H8	C4, C8
4	130.9, CH	8.04, d (8.8)	H6	C3, (C4), C7, C9
4a	136.5, C			
5	129.1, CH	7.95, br d (8.1)	H2	C1, C5, C9
6	130.5, CH	7.67, m	H3	C4, C10
7	128.9, CH	7.66, m	H8	C3, C9
8	130.5, CH	8.10, br d (8.1)		C2, C4
8a	133.7, C			

^a Enregistré à 125MHz dans le MeOD

^b Enregistré à 600MHz dans le MeOD

Cette molécule n'a jamais été décrite dans la littérature en tant que produit naturel. Nous avons un doute quant au caractère naturel ou non de ce composé du fait de sa structure (bis-naphthalényle).

Enfin, l'étude de la fraction 6 a permis d'isoler 3 analogues structuraux de même poids moléculaire et de même formule brute, ils ont été numérotés de SNB-2 à SNB-4. La comparaison des spectres de RMN avec ceux de la molécule précédemment isolée dans

l'extrait de la souche SNB-VECD11D (cf. p123) montre qu'il s'agit de molécules analogues. La structure plane du composé SNB-1 est celle représentée **Figure 50**. Les composés SNB-2 et SNB-3 n'ont pas été formellement identifiés mais la comparaison des spectres de RMN indique que ce sont des analogues de SNB-1 (**Figure 50**).

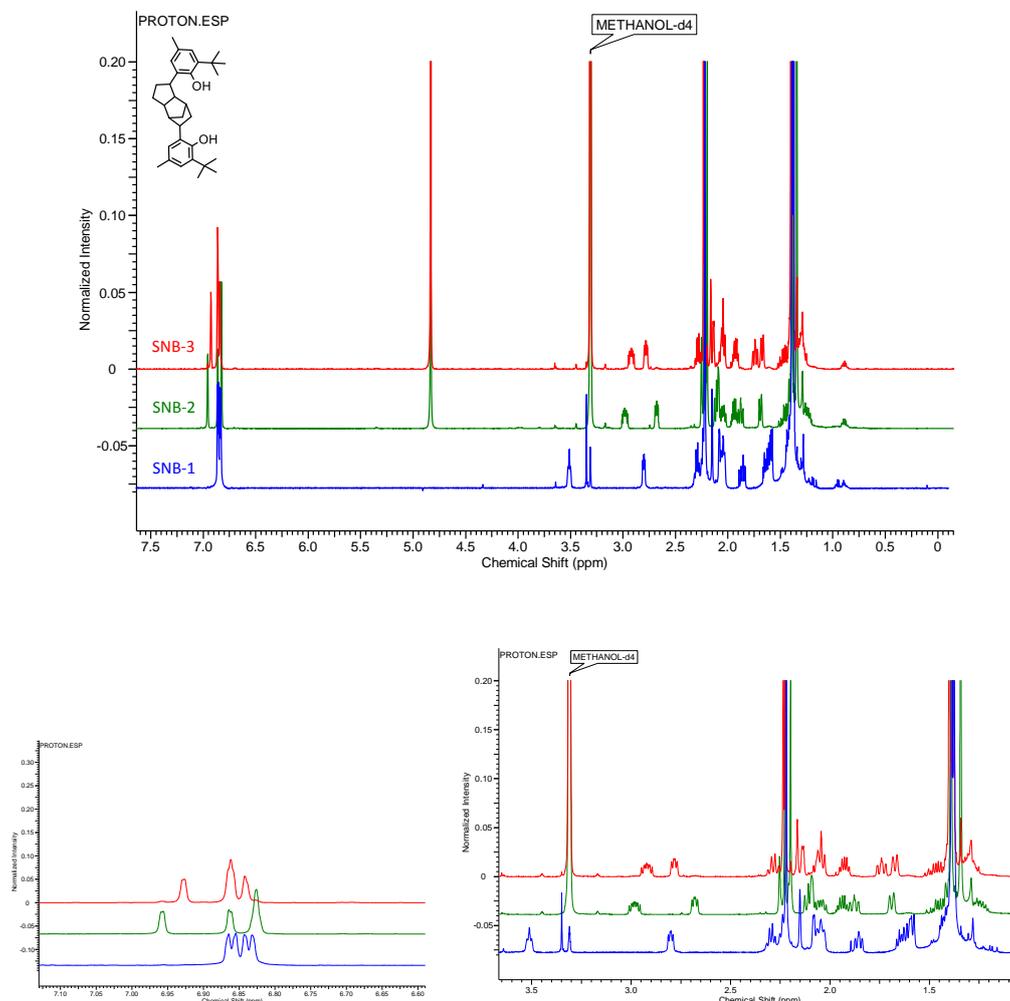


Figure 50 : Comparaison RMN ^1H des composés isolés de SNB-VECD11D et SNB-VECD14B (600 MHz, MeOD)

Il est étonnant de retrouver ces structures si similaires provenant de deux souches différentes dont l'une est de nature fongique et l'autre bactérienne. Cela confirme les doutes quant au caractère non naturel de ces composés.

Cette série de composés sera testée prochainement afin de vérifier si les molécules n'ont pas été responsables de faux positifs dans les essais réalisés sur les différentes fractions.

6 Etude chimique de l'extrait de *Pestalotiopsis theae* SNB-VECD14E

Les champignons du genre *Pestalotiopsis* spp.

Classification

Règne : Fungi

Division : Ascomycota

Classe : Deuteromycetes

Ordre : Xylariales

Famille : Amphisphaeriaceae

Genre : *Pestalotiopsis*



Pestalotiopsis theae, comme les autres champignons du genre, n'est pas hôte spécifique. Il a déjà été isolé d'un grand nombre d'organismes macroscopiques.^{242,243} Communément pathogène, il est responsable d'une maladie appelée « brûlure grise » chez les feuilles de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze²⁴⁴ et est responsable de nécrose chez de nombreuses plantes tropicales telles que *Coco nucifera* L., *Diospyros kaki*, ou encore *Mangifera indica*. La pathogénicité des souches n'est pas constante, le caractère parasite ou symbiotique d'une même souche dépendrait de nombreux paramètres environnementaux.²⁴⁵ Plusieurs *Pestalotiopsis* entomopathogènes ont également été décrits par l'équipe de Ding. Ces derniers ont montré une toxicité importante de *P. theae* sur *Hemiberlesia pitysophila*, insecte exotique nuisible des forêts de pin.²⁴⁶ Les précédentes études chimiques de champignon du genre *Pestalotiopsis* ont permis l'isolement de phytotoxines,²⁴⁷ de régulateurs de croissance des plantes²⁴⁸ et d'autres

²⁴² Jeewon R, Liew ECY, et al. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. *Fungal Diversity*. 2004; 17:39–55.

²⁴³ Wei JG, Xu T, et al. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae in southern China. *Fungal Diversity*. 2007; 24:55–74.

²⁴⁴ Koh JY, Shin GH, et al. Seasonal occurrence and development of grey blight of tea plants in Korea. *Plant Pathol J*. 2001; 17:40–44.

²⁴⁵ Douanla-Meli C, Langer E. *Pestalotiopsis theae* (Ascomycota, Amphisphaeriaceae) on seeds of *Diospyros crassiflora* (Ebenaceae). *Mycotaxon*. 2009; 107:441–448.

²⁴⁶ Lv C, Huang B, et al. Entomopathogenic Fungi on *Hemiberlesia pitysophila*. *PLoS One*. 2011; 8:e23649.

²⁴⁷ Kimura Y, Kouge A, et al. Pesthetoxin, a new phytotoxin produced by the gray blight fungus, *Pestalotiopsis theae*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998; 62:1624–1626.

²⁴⁸ Shimada A, Takahashib I, et al. Chloroisosulochrin, chloroisosulochrin dehydrate, and pestheic acid, plant growth regulators, produced by *Pestalotiopsis theae*. *Z Naturforsch*. 2001; 56b:797–803.

métabolites secondaires ayant des propriétés antifongiques,²⁴⁹ antivirales²⁵⁰ et anti-tumorales (Figure 51).

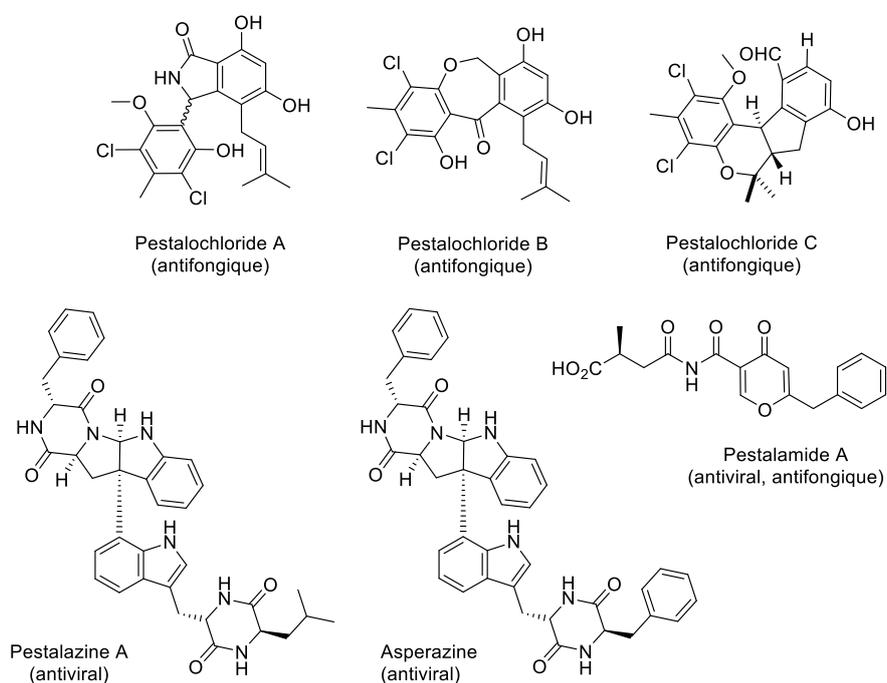


Figure 51: Exemples de métabolites secondaires isolés de champignons du genre *Pestalotiopsis*

²⁴⁹ Erwei L, Lihua J, et al. Pestalachlorides A–C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16:7894–7899.

²⁵⁰ Gang D, Lihua J, et al. Pestalazines and pestalamides, bioactive metabolites from the plant pathogenic fungus *Pestalotiopsis theae*. *J Nat Prod*. 2008; 71:1861–1865.

Résultats de l'étude chimique de l'extrait de *Pestalotiopsis theae* :

SNB-VECD14E

Le champignon *Pestalotiopsis theae* SNB-VECD14E a été isolé à partir d'un insecte de la famille des Diaspididae récolté sur une plante du genre *Citrus*.

❖ Fractionnement

Cette souche a été sélectionnée pour l'activité larvicide de son extrait sur *Aedes aegypti* avec un taux de mortalité de 87,8 % à 24h, testé à 100 ppm. L'extrait ne présentait pas d'activité antimicrobienne significative sur les différents pathogènes testés (MIC de 128 à 256 µg/mL).

Après avoir cultivé cette souche à grande échelle sur 96 grandes boîtes de Petri (Ø 24 cm), nous avons obtenu 2,16 g d'extrait brut dont 1 g a été fractionné pour aboutir à 8 fractions, noté FI à FVIII.

Afin d'effectuer un fractionnement biodirigé, les fractions ont été testées sur *Aedes aegypti* à 100 ppm. Les activités sont présentées dans le **Tableau 8**.

A l'issue du criblage, nous avons choisi d'étudier les fractions V et VI présentant des activités respectives de 88 et 95% de mortalité des larves à une concentration d'extrait de 100 ppm.

Tableau 8 : Activité larvicide des fractions de l'extrait SNB-VECD14E testées à 100 ppm à 24 h

Fractions	Quantité (mg)	Act. Larvicide ^a (% mortalité)
I	0,6	n.d ^a
II	8,3	0
III	181,9	n.d ^a
IV	252,4	51,0
V	77,7	88,0
VI	70,7	95,0
VII	188,2	77,5
VIII	67,1	5,1

^a n.d : non déterminé

❖ Caractérisation des composés isolés

A partir de la fraction VI, 6 composés ont été isolés. L'analyse du spectre de RMN ¹H a montré des signaux caractéristiques d'acide gras pour l'ensemble de ces composés. Puis,

l'étude de la fraction V a permis d'isoler 2 composés (notés **1** et **2**) ainsi que plusieurs acides gras (Figure 52).

Le composé (**1**) a été isolé sous la forme d'un résidu brun. L'analyse du spectre de masse à haute résolution a permis d'établir que l'ion pseudomoléculaire avait une masse de m/z 383,0543 $[M+H]^+$, correspondant à la formule brute $C_{17}H_{15}ClO_8$ (masse calculée : m/z 383,0528). L'analyse du spectre proton, a permis d'identifier ce composé comme étant la dihydromaldoxine par comparaison avec les données de la littérature.²⁵¹

Le composé (**2**), a quant à lui, été isolé sous forme d'un résidu blanchâtre, l'analyse du spectre de masse a permis d'établir que l'ion pseudomoléculaire avait une masse de m/z 505.3572 $[M+H]^+$, correspondant à la formule brute $C_{30}H_{48}O_6$ (masse calculée : m/z 505.3524). Ces données, couplées aux données RMN, nous ont permis d'identifier cette molécule comme étant l'anicéquol, par comparaison avec les données de la littérature.²⁵²

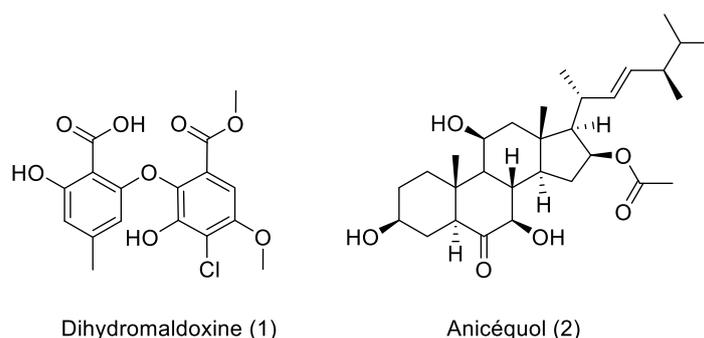


Figure 52 : Molécules isolées de l'extrait SNB-VECD14E

Les données spectrales des molécules isolées de *Pestalotiopsis theae* sont disponibles en annexe.

❖ Evaluation biologique

L'ensemble des molécules isolées ont été testées afin d'évaluer leur activité larvicide sur *Ae. aegypti*. Nous avons pu observer que les acides gras ne montraient aucune activité à la concentration de 10 ppm. Quant à la dihydromaldoxine et à l'anicéquol, elles induisaient des taux de mortalité respective de 12,8 et 3,8%.

²⁵¹ Xu X, Zhang F, et al. Identification of the first diphenyl ether gene cluster for pesthelic acid biosynthesis in plant endophyte *Pestalotiopsis fici*. *Chembiochem*. 2014; 15:284–292.

²⁵² Igarashi Y, Sekine A, et al. Anicequol, a Novel Inhibitor for Anchorage-independent Growth of Tumor Cells from *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx TP-F0213. *J Nat Antibio*. 2002; 55:371–376.

❖ Conclusion

L'extrait de *P. theae* SNB-VECD14E a été étudié pour l'activité larvicide de son extrait. Le fractionnement bio-guidé mené sur les fractions actives a permis l'isolement de nombreux acides gras, et deux composés connus : la dihydromaldoxine et l'anicéquol. La dihydromaldoxine, précédemment isolée de plusieurs souches fongiques dont des champignons du genre *Pestalotiopsis*,²⁵³ est un éther de diphényle chloré. Elle a été décrite dans la littérature comme possédant des propriétés anti-inflammatoires.²⁵³ Xu et son équipe ont identifié le cluster de gène impliqué dans la biosynthèse de ce composé chez *Pestalotiopsis fici*.²⁵¹

Quant à l'anicéquol, il a précédemment été isolé d'un champignon du genre *Penicillium* et inhiberait l'ancrage de cellules tumorales.²⁵²

Bien que nous ayons étudié l'extrait selon une approche bio-dirigée nous n'avons pas retrouvé les métabolites responsables de l'activité observée pour l'extrait brut et les fractions. Les deux molécules isolées ne présentent pas d'activité larvicide. Ainsi l'activité des fractions pourrait être due à d'autres composés minoritaires dans l'extrait ou aux nombreux acides gras produits par la souche. Les AG testés n'ont pas montré d'activité lors des essais larvicides à 10 ppm. Or les AG (et sels d'acides gras) sont pourtant décrits dans la littérature comme présentant de nombreuses activités dont des activités insecticides.²⁵⁴ Ils présentent l'avantage d'être applicable sur une grande variété d'insectes, et de plantes sans être toxique pour l'environnement et les animaux. De plus ils sont compatibles avec l'utilisation d'autres insecticides.²⁵⁵ Leur mode d'action n'est pas bien défini mais la toxicité de ces composés, utilisés comme insecticides de contact, pourraient s'expliquer par une occlusion mécanique des ouvertures chez l'insecte ou par les propriétés caustiques des constituants alcalins (pour les sels d'AG).²⁵⁶ L'activité des AG évolue dans le même sens que leurs poids moléculaires,²⁵⁶

²⁵³ Schreiber D, Jung M, et al. 3'-Demethyl dihydromaldoxin and dihydromaldoxin, two anti-inflammatory diaryl ethers from a *Steganospora* species. *J Antibiot.* 2012; 65:473–477.

²⁵⁴ Siegler EH, Popenoe CH. Some insecticidal properties of the fatty acid series. *J Agri Res.* 1924; 19:259–261.

²⁵⁵ Siegler EH, Popenoe CH. The fatty acids as contact insecticides. *J Econom Entomol.* 1925; 18:292–299.

²⁵⁶ Tattersfield F, Gimingham T. The insecticidal action of the fatty acids, their methyl esters and sodium and ammonium salts. In: *Studies on contact insecticides.*

ainsi les AG régulièrement mentionnés comme actifs sont les acides linoléique,²⁵⁷ linoléique,^{258,259} oléique²⁵⁹ ou stéarique.²⁶⁰ Les fractions ayant été testées à 100 ppm nous pourrions tester la même concentration pour les AG. Ces derniers ne présentant pas un mode d'action spécifique, il se peut qu'ils soient actifs à la même concentration que la fraction puisque celle-ci est essentiellement constituée d'acide gras. Ils pourraient même être moins actifs si d'éventuelles synergies étaient mises en jeu.

²⁵⁷ Adebowale K, Adedire C. Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. *Afr J Biotech.* 2006; 5:901–906.

²⁵⁸ Ramsewak RS, Nair MG, et al. Insecticidal fatty acids and triglycerides from *Dirca palustris*. *J Agri Food Chem.* 2001; 49:5852–5856.

²⁵⁹ Rahuman AA, Venkatesan P, et al. Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. *Parasitology Research.* 2008; 103:1383-1390.

²⁶⁰ Figueroa-Brito R, Camino M, et al. Fatty acid composition and toxic activity of the acetonic extract of *Carica papaya* L.(Caricaceae) seeds. *Phyton Inter J Exp Bot.* 2002; 69:97-99.

7 Etude chimique de l'extrait d'*Asaia* sp. SNB- VECD15A

Les champignons du genre *Asaia* sp.

Classification

Règne : Bacteria

Division : Proteobacteria

Classe : Alphaproteobacteria

Ordre : Rhodospirillales

Famille : Acetobacteraceae

Genre : *Asaia*



Le genre *Asaia* comprends quatre espèces principales: *A. bogorensis*, *A. sianmensis*, *A. krungthepensis* et *A. lannaensis*.²⁶¹

Il s'agit de bactéries aérobies à Gram négatif se présentant sous la forme de colonies roses. Elles sont classées dans la famille des Acetobacteraceae. Elles appartiennent au groupe des bactéries acétiques ce qui les rapproche phylogénétiquement des genres *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas* et *Gluconacetobacter*.²⁶² Néanmoins contrairement à ces dernières, *Asaia* sp. ne produit que peu ou pas d'acide acétique à partir d'éthanol et voit sa croissance inhibée en présence de 35% d'acide acétique.²⁶³

Les habitats naturels de cette bactérie sont principalement les fleurs et plantes en zone tropicale.²⁶² Sa croissance est inhibée à 37°C, par conséquent elle n'est pas considérée comme pathogène pour l'Homme.²⁶²

Le genre *Asaia* est aussi décrit comme associé à de nombreuses espèces de moustiques du genre *Anopheles* (principalement *A. stephensi*). On retrouve ces bactéries au niveau du système reproductif des moustiques adultes et de l'intestin des larves. La transmission entre individus se fait de manière horizontale et verticale.²⁶⁴ Bien que son rôle n'ait pas été établi, sa prévalence aux différents stades de développement laisse

²⁶¹ Horsáková I, Voldřich M, et al. *Asaia* sp. as a Bacterium Decaying the Packaged Still Fruit Beverages. *Czech J Food Sci.* 2009; 27:362–365.

²⁶² Moore JE, McCalmont M, et al. *Asaia* sp., an Unusual Spoilage Organism of Fruit-Flavored Bottled Water. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68:4130–4131.

²⁶³ Yamada Y, Katsura K, et al. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000; 50:823–829.

²⁶⁴ Favia G, Ricci I, et al. Bacteria of the Genus *Asaia*: A Potential Paratransgenic Weapon Against Malaria. In: *Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease. Advances in Experimental Medicine and Biology.* Ed. Aksoy S. 2008. 627.

penser qu'*Asaia* sp. jouerait un rôle important et pourrait être un symbionte bénéfique des Anophèles.²⁶⁵

²⁶⁵ Favia G, Ricci I, et al. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:9047–9051.

Résultats de l'étude chimique de l'extrait d'*Asaia* sp. SNB-VECD15A

La bactérie *Asaia* sp. SNB-VECD15A a été isolée à partir d'un insecte appartenant à l'Ordre des Hemiptères (Sternorrhyncha) récolté sur un goyavier en Guyane française.

Elle a été sélectionnée lors du criblage pour son activité larvicide sur *Ae. aegypti* (75,5 % mortalité observée à 100 ppm). Nous avons constaté lors de la remise en culture de la souche que cette dernière avait perdu son activité avec un taux de mortalité sur les larves de l'ordre de 8% à 100 ppm au bout de 24h.

L'analyse des profils métabolomiques des deux extraits sur HPLC a mis en évidence d'importantes différences (Figure 53). Il semblerait qu'après repiquage la bactérie ait cessé la production de métabolites secondaires. En effet, les profils apparaissent totalement différents et les quantités observées sont bien inférieures dans le second extrait.

Afin de réactiver les voies de biosynthèse des métabolites et ainsi retrouver l'activité de la souche, nous avons utilisé la méthode OSMAC. Ainsi différents milieux MH ont été préparés, incluant pour certains du lysat de levure à trois concentrations différentes. Cette technique a déjà été employée au laboratoire avec succès pour réactiver l'antibiose chez une souche fongique du genre *Chrysosporthe*.²⁶⁶ Pour réactiver l'activité larvicide trois milieux de culture MH contenant des concentrations différentes de chitine ont été testés ainsi qu'un milieu MH contenant des cellules d'insectes lyophilisées.

L'ensemble des cultures ainsi que les milieux seuls ont été extraits à l'AcOEt. Les profils ont été réalisés sur UHPLC et des essais larvicides et antimicrobiens ont été réalisés pour chacun de ces extraits afin d'observer la réactivation éventuelle de la biosynthèse de composés bioactifs.

²⁶⁶ Nirma C, Eparvier V, et al. Reactivation of antibiosis in the entomogenous fungus *Chrysosporthe* sp. SNB-CN74. J Antibiot. 2015; 68:586–590

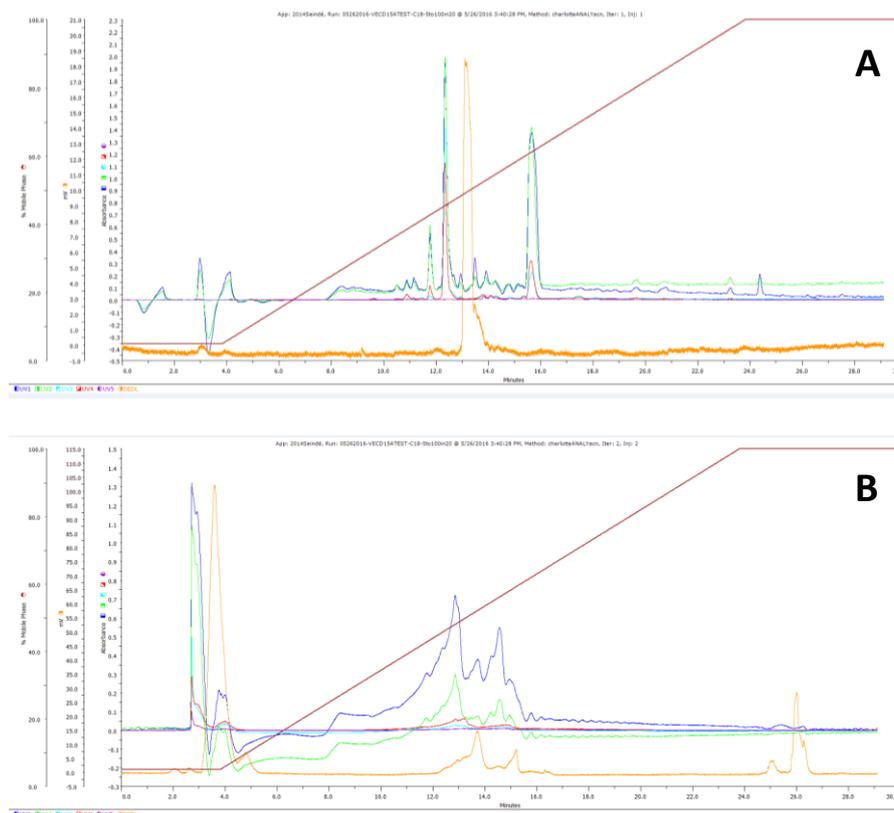


Figure 53 : Comparaison des profils métabolomiques sur HPLC des extraits AcOEt d'*Asaia* sp. à la concentration de 5 mg/mL (A) Extrait initial après isolement à partir de l'insecte hôte, (B) Extrait après repiquages successifs.

Les résultats d'activités obtenus nous montrent qu'aucun milieu de culture utilisé n'a permis de réactiver la production de métabolites actifs (**Tableau 9**). Ces résultats sont confirmés par l'observation des profils métabolomiques ou aucune différence n'est observée entre les extraits de milieux et les extraits issus des cultures bactériennes (Cf Annexes). De plus l'observation des cultures montre que la bactérie ne se développe que très peu dans les boîtes.

Tableau 9 : Résultats des tests d'activité antimicrobienne et larvicide des extraits bruts de VECD15A sur différents milieux de culture

milieu	Test d'activité				
	Tx mortalité (%)		CMI (µg/mL)		
	<i>Ae. aegypti.</i>	<i>S. aureus</i>	SARM	<i>T. rubrum</i>	<i>C. albicans</i>
MH + chitine à 5 g/L	4	256	256	>256	>256
MH + chitine à 2 g/L	5	>256	256	>256	>256
MH + chitine à 1 g/L	12	>256	256	>256	>256
MH + lysat de levure à 5 g/L	4	>256	>256	>256	>256
MH + lysat de levure à 2 g/L	2	>256	256	>256	>256
MH + lysat de levure à 1 g/L	2	>256	256	>256	>256
MH + cellules d'insectes	4	>256	>256	>256	>256

La question de l'origine des composés actifs s'est donc posée pour cette souche bactérienne. Les repiquages successifs semblent avoir eu un effet délétère sur la croissance de la bactérie et ses capacités biosynthétiques se sont érodées. Le rôle écologique des bactéries du genre *Asaia* est peu connu et le fait qu'elle ait été isolée d'insectes peut laisser supposer la nécessité d'un organisme hôte ou associé à cette bactérie. Ce dernier fournirait une niche de développement spécifique à la bactérie tout en contribuant à la production de métabolites à des fins de signaux ou de défense entre la bactérie et son hôte.

Une autre hypothèse pourrait mettre en jeu un éventuel mécanisme de co-production de métabolites secondaires où la bactérie et son hôte seraient impliqués dans la biosynthèse de métabolites actifs, chacun faisant intervenir sa machinerie enzymatique. Ce phénomène a pu être décrit dans le cas des plantes et leurs endophytes associés.²⁶⁷

²⁶⁷ Kusari S, Zuehlke S, et al. Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte on camptothecin biosynthesis. *J Nat Prod.* 2011; 74:764–775.

Analyse transversale

Dans le présent projet nous avons pu démontrer que selon notre hypothèse de départ des souches de champignons et bactéries présents sur des insectes contaminés pouvaient produire des composés à la fois antimicrobiens mais aussi insecticides. Une sélection des extraits de ces souches présentant au moins une de ces activités a été effectuée afin d'isoler la ou les molécules responsables des activités observées. Pour cette étude chimique, nous avons tenu compte de l'originalité de la souche et des activités observées lors des essais biologiques.

Conscients que ces paramètres à eux seuls ne permettent pas nécessairement de distinguer les souches les plus pertinentes à étudier, nous avons entrepris d'explorer la diversité chimique au sein de la collection entière de micro-organismes obtenus au cours du projet.

Pour cela une collaboration a été effectuée avec le Dr. Pierre-Marie Allard et Léonie Pelissier de l'équipe du Pr. Jean-Luc Wolfender de l'Université de Genève. L'ensemble des extraits à l'AcOEt obtenus pour chaque souche de micro-organismes a été envoyé pour être analysé par UHPLC-MSMS en mode positif, l'objectif étant de générer des réseaux moléculaires à partir des données MS². Le but de cette analyse est :

- d'étudier les grandes familles/classes de métabolites potentiellement produits par les souches,
- d'observer la présence ou non d'analogues structuraux des composés isolés et,
- de comparer les métabolomes des différentes souches afin de mettre en évidence d'éventuels métabolites communs.

Cette analyse peut aussi nous permettre, en utilisant des filtres (ex : activité, origine du micro-organisme, phylogénie etc.), de distinguer des clusters d'ions d'intérêts, mais aussi d'observer des souches présentant des zones de diversité. De plus cette analyse peut permettre par déréduplication d'identifier des composés que nous n'avons pas isolés lors de notre étude et de mettre en évidence d'autres composés originaux.²⁶⁸

²⁶⁸ Yang JY, Sanchez LM, et al. Molecular networking as a dereplication strategy. *J Nat Prod.* 2013; 76:1686–1699.

Ainsi plus de 20 000 spectres ont été traités et regroupés en 6000 clusters impliqués dans 821 réseaux.

Le principe des réseaux moléculaires repose sur le fait que des molécules structurellement proches possèderaient des voies de fragmentations similaires. Ainsi pour un jeu de données les spectres MS² sont comparés deux à deux par alignement spectral conduisant à l'attribution d'un indice de corrélation (cosine score) pour chaque paire d'ions. L'alignement repose sur un algorithme tenant compte de la différence entre les valeurs m/z et leur intensité (deux spectres superposables ont un CS de 1, alors que deux spectres sans ions communs ont un CS de 0).

Pour générer les réseaux moléculaires les données MS² sont converties au format .mzXML et téléchargées vers la plateforme Global Natural Products Network (GNPS : <http://gnps.ucsd.edu>). Les données sont ensuite traitées et les résultats sont interprétés graphiquement via le logiciel de visualisation Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>).

Pour faciliter la visualisation et la compréhension du réseau nous y avons ajouté un filtre montrant les identifications phylogénétiques. Des bibliothèques spectrales de substances naturelles ont également été importées afin de faciliter la déréplication.

Pour débiter l'exploration du réseau, nous avons tout d'abord concentré nos recherches sur les métabolites isolés au cours du projet et leurs analogues potentiels. Ainsi nous avons pu mettre en évidence plusieurs clusters d'intérêt.

S'agissant de la souche bactérienne *Pantoea* sp. SNB-VECD14B, nous avons pu mettre en évidence un cluster comprenant les dérivés hydroxy-acylphénylalanine isolés (Article 4). A partir des ions identifiés, il nous a été possible de déduire la structure des analogues de proche en proche, à partir des données m/z, des temps de rétention (via le logiciel MZmine 2) et par observation des motifs de fragmentation. Des fragments à m/z 120,08 et 166,05 correspondant au motif phénylalanine ont notamment été repérés. Nous avons donc constaté que la bactérie produisait de nombreux analogues, non isolés car probablement produits en très faibles quantités. En outre, nous avons remarqué que certains des analogues observables sur le réseau correspondent vraisemblablement à des molécules synthétisés que la souche produirait donc également en faible quantité (Figure 54). Nous constatons également que certaines de ces molécules ne seraient pas exclusivement produites par *Pantoea* sp. Il apparait que d'autres souches, exclusivement bactériennes, auraient la capacité de biosynthétiser cette classe de composés.

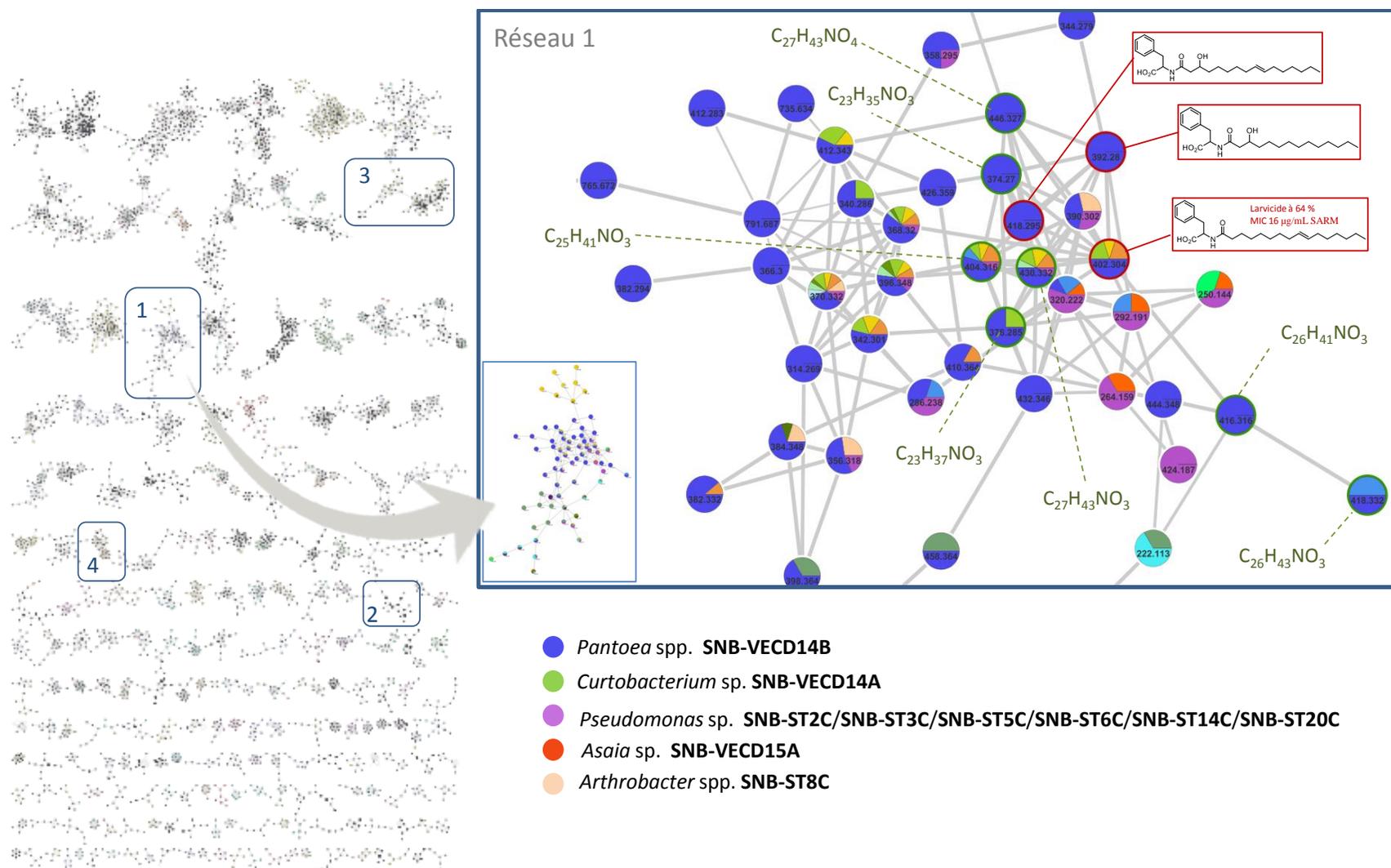


Figure 54 : A gauche : ensemble des réseaux moléculaires de la totalité des extraits à l'AcOEt – A droite : Réseau 1 correspondant majoritairement à *Pantoea* sp. contenant les hydroxy-acylphenylalanines isolées (clusters entourés en rouge) et des analogues potentiels (clusters cerclés en vert).

Nous avons également observé un réseau correspondant à des dicétopipérazines (Figure 55). Un grand nombre d'entre elles ont été identifiées via les bibliothèques spectrales GNPS. On constate que ces dernières sont produites par la quasi-totalité des souches isolées, qu'elles soient bactériennes ou fongiques. Il est d'ailleurs rapporté dans la littérature que ces dipeptides cycliques sont biosynthétisés par de nombreux organismes (champignons, bactéries, plantes, etc.) tels quels ou imbriqués dans des motifs plus complexes.²⁶⁹ Elles sont connues pour avoir de nombreuses activités biologiques du fait de leur structure leur permettant de se lier à de nombreux récepteurs et cibles.²⁶⁹ Seules trois dicétopipérazines ont été isolées au cours de ce projet (extrait de la souche *Pantoea* spp. SNB-VECD14B). De manière générale les fractions les plus actives dans les souches étudiées étaient relativement apolaires et ne contenaient donc pas les DKP, plus polaires.

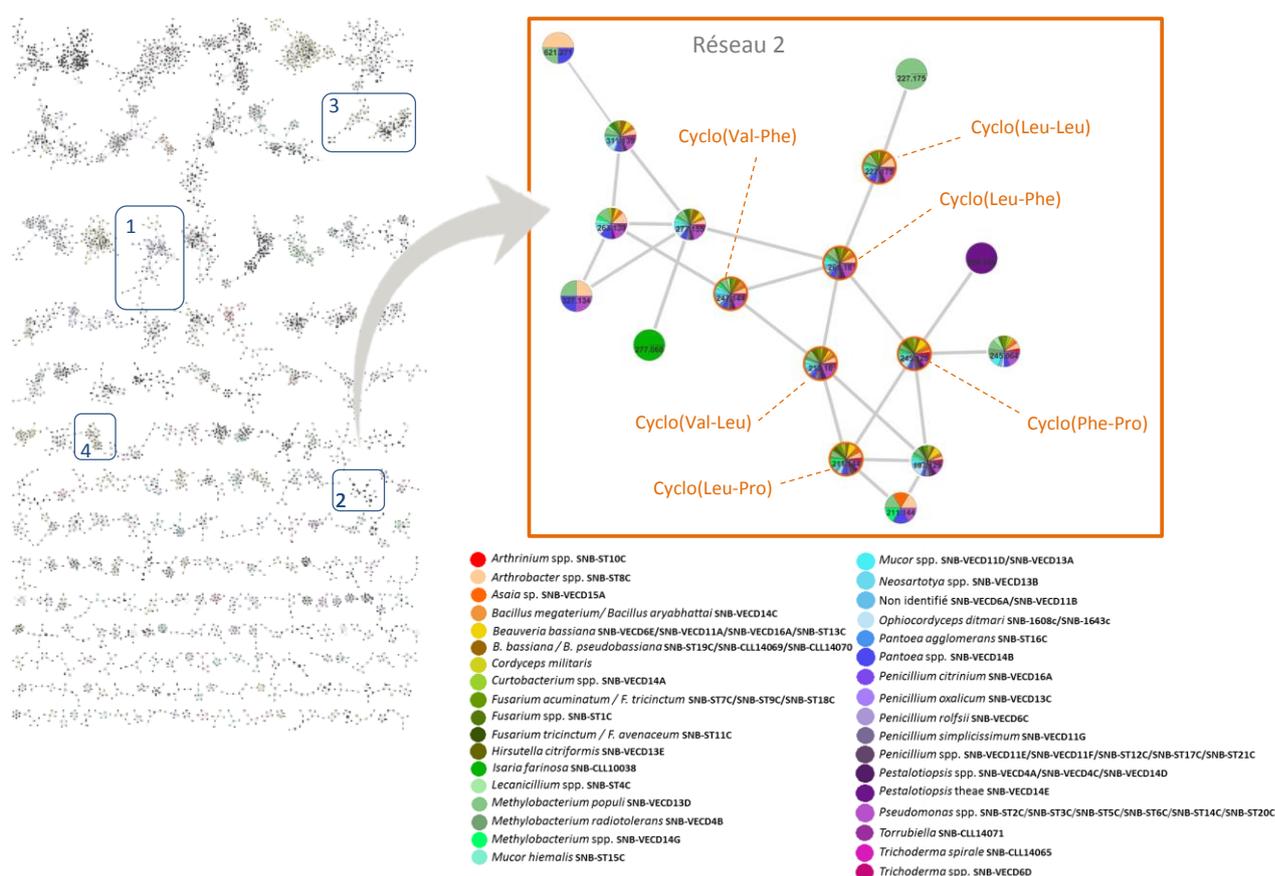


Figure 55 : Réseau 2 correspondant aux dicétopipérazines.

²⁶⁹ Borthwick AD. 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. Chem Rev. 2012; 112:3641–3716.

Nous avons ensuite exploré les réseaux correspondant aux souches actives non étudiées au cours du projet. En effet le criblage biologique a mis en lumière l'activité de plusieurs souches du genre *Penicillium*, *Fusarium* ou encore *Beauveria* (Tableau 3). Ces micro-organismes ayant fait l'objet de nombreuses études nous avons orienté notre choix sur l'étude d'autres micro-organismes. Néanmoins il apparaissait intéressant d'observer quels pouvaient être les composés à l'origine des activités. Ainsi plusieurs réseaux associés aux champignons du genre *Beauveria* ont été mis en évidence. Leur étude a permis d'identifier plusieurs clusters de spectres correspondants à des beauvéricines. Dans un second réseau associé aux champignons du genre *Fusarium* nous avons pu identifier différentes enniatines (Figure 56).

Les enniatines ont été découvertes pour la première fois à partir d'une souche de *Fusarium oxysporum*.²⁷⁰ Depuis de nombreuses espèces fongiques (des genres *Beauveria*, *Verticillium* et *Alternaria*) ont été décrites comme produisant ces métabolites.²⁷¹ Elles présentent des propriétés antibiotiques, insecticides, anti-parasitaires et herbicides.²⁷² Les beauvéricines, bien que structurellement proche, diffèrent par la nature de l'acide aminé *N*-méthylé. Elles présentent également des activités antimicrobiennes et insecticides, en plus d'être anti-tumorales.²⁷³

²⁷⁰ Gaiumann E, Roth S, et al. Enniatin, ein neues gegen mykobakterien wirksames antibiotikum. *Experientia*. 1947; 3:202–203.

²⁷¹ Nilanonta C, Isaka M, et al. Unusual enniatins produced by the insect pathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum*: isolation and studies on precursor-directed biosynthesis. *Tetrahedron*. 2003; 59:1015–1020.

²⁷² Tomoda H, Huang X, et al. Inhibition of acyl-CoA : Cholesterol acyltransferase activity in cyclodepsipeptide antibiotics. *J Antibiot*. 1992; 45:1626–1632.

²⁷³ Wang Q, Xu L. Beauvericin, a bioactive compoung produce by fungi : a short review. *Molecules*. 2012; 23:2367–2377.

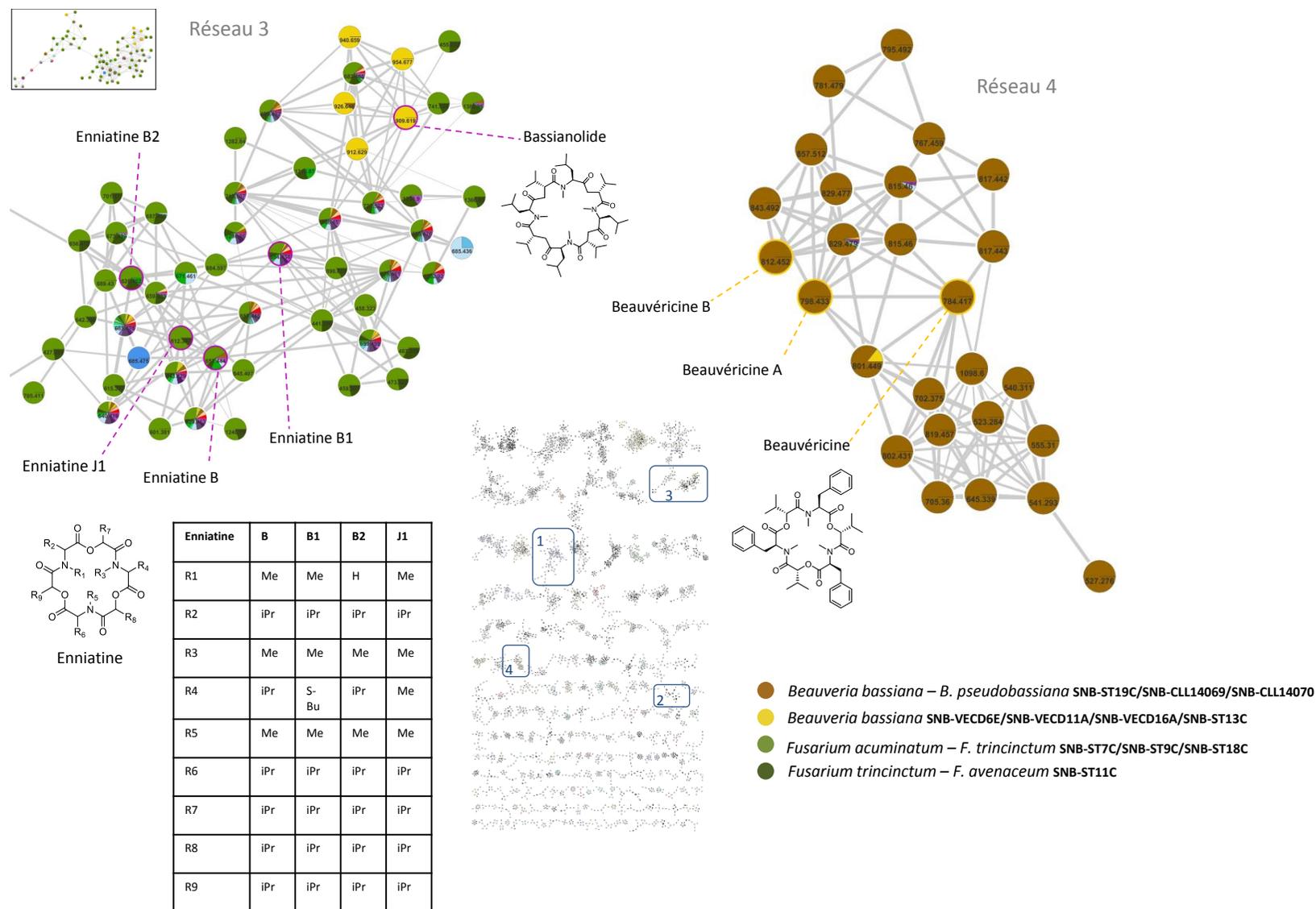


Figure 56 : Réseaux 3 et 4 correspondant aux cyclodepsipeptides bioactifs des champignons des genres *Beauveria* et *Fusarium*.

L'étude de la composition chimique d'extraits naturels est une tâche laborieuse et souvent très complexe. Ainsi l'analyse par réseaux moléculaires à partir des données LCMS² s'avère être un outil de choix pour faciliter l'exploration et la caractérisation d'extraits. Cette approche, basée sur des techniques analytiques modernes, apporte une vaste gamme d'informations sur le métabolome des espèces étudiées. Il est ainsi possible d'identifier des groupes moléculaires spécifiques de certaines souches ou au contraire partagés entre diverses souches ou d'effectuer de fines comparaisons entre plusieurs échantillons. Dans le présent projet, l'usage des réseaux moléculaires nous a permis d'appréhender la diversité chimique au sein de notre collection de micro-organismes sans entrer dans un long processus de fractionnement. Bien que non présenté ici, l'injection de molécules pures utilisées comme standards et leurs annotations dans notre réseau a permis de cibler plus rapidement les clusters d'intérêts et d'optimiser la caractérisation des extraits.

Discussion et Conclusion

Ces travaux de thèse avaient pour objectif la découverte de composés antimicrobiens et insecticides à partir de micro-organismes entomopathogènes.

Ainsi à partir d'insectes vivants contaminés nous avons effectué, dans un premier temps, l'isolement et l'identification de micro-organismes associés. Ces insectes ont été récoltés sur le territoire français (Guyane française et métropole). Dans un second temps, l'extraction et l'identification des métabolites secondaires produits par ces souches ont été effectuées. Pour cela, un criblage biologique des 57 extraits de micro-organismes a été réalisé sur larves *Aedes aegypti* et sur une sélection de micro-organismes pathogènes pour l'Homme. Cette évaluation a permis de sélectionner 6 souches : des souches fongiques du genre *Mucor* spp. (SNB-VECD11D et SNB-VECD13A), *Isaria farinosa* (SNB-CLL10038), *Pestalotiospsis theae* (SNB-VECD14E) et les souches bactériennes *Pantoea* spp. (SNB-VECD14B) et *Asaia* sp. (SNB-VECD15A). Chacun des extraits de souche a subi par la suite un fractionnement bio-dirigé.

Tout d'abord, nous avons sélectionné et étudié deux souches fongiques du genre *Mucor* présentant des activités biologiques et des profils métabolomiques différents. L'étude de la première souche (SNB-VECD11D) a permis d'isoler 6 composés dont deux nouveaux dérivés tétrahydrofuraniques présentant une activité antibactérienne sur *S. aureus* et SARM. A partir de cette souche nous avons également isolé l'acide déhydroabiétique ainsi que deux dérivés diterpénoïques de type abiétane et pimarane (Article 1). Dans notre étude, l'acide déhydroabiétique présente de faibles activités antimicrobiennes mais une bonne activité larvicide (65 % mortalité), et ces deux dérivés présentent des activités antibactériennes sur *S. aureus* et SARM. De plus, nous avons mis en évidence que la souche du genre *Mucor* étudiée élabore plusieurs composés d'activités complémentaires utilisant les mêmes voies biosynthétiques. Cela ferait d'eux de meilleurs compétiteurs, contribuant ainsi à leur succès écologique dans l'environnement.

L'étude de la seconde souche du genre *Mucor* (SNB-VECD13A) a permis l'isolement de 8 composés dont un nouveau : la mucorolactone. Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article 2 de ce manuscrit. Bien que la mucorolactone soit inactive sur les cibles étudiées au cours de ce projet, cette molécule présente un squelette original

puisque aucun analogue n'a été décrit dans la littérature jusqu'à ce jour. Sa structure soulève donc des questions quant à sa voie de biosynthèse.

L'étude chimique du champignon entomopathogène *Isaria farinosa* SNB-CLL10038 a permis l'isolement de 13 composés dont 4 sont nouveaux. Parmi les composés identifiés nous retrouvons une série d'acides tétramiques dont deux présentent des activités antibactériennes. Plusieurs analogues possédant ce squelette sont décrits dans la littérature pour leurs activités antibactériennes.^{274,275} Dans le présent projet, nous avons en plus réussi à obtenir pour la première fois la configuration absolue de la paécilosétine.

Le travail effectué sur la bactérie du genre *Pantoea* SNB-VECD14B, a permis d'isoler et d'identifier 12 composés dont 3 sont nouveaux. Il s'agit d'hydroxy-acylphénylalanines présentant des activités larvicides et/ou antimicrobiennes. La synthèse d'analogues structuraux a permis d'étudier les relations de structure activité (RSA) de cette classe de molécules. L'exploration par réseaux moléculaires a mis en évidence que la souche bactérienne produisait naturellement, en petite quantité, certains des composés synthétisés bien que nous n'ayons pas pu les isoler.

Puis, à partir de la souche SNB-VECD14E nous avons isolé deux molécules connues dont aucune ne présente d'activités sur les cibles du projet.

Enfin, l'étude de la souche SNB-VECD15A n'a pas permis l'isolement de composés bioactifs. Sélectionnée pour son activité larvicide (75,5 % mortalité), elle a perdu son activité lors de la remise en culture. L'enregistrement des profils UHPLC de l'extrait brut initial obtenu lors de l'isolement de la souche et l'extrait obtenu suite à la remise en culture a montré d'importants changements au niveau du métabolome.

D'un point de vue général ce travail a mené à l'isolement de 41 composés dont 10 nouveaux. Parmi les composés évalués biologiquement, 6 présentent des activités antimicrobiennes alors que 4 présentent des activités larvicides (**Tableau 10 – 14**). S'agissant de l'activité antimicrobienne les souches de *Staphylococcus* et *T. rubrum* se

²⁷⁴ Zhao S, Chen S, et al. Four new tetramic acid and one new furanone derivatives from the plant endophytic fungus *Neopestalotiopsis* sp. *Fitoterapia*. 2015; 103:106–112.

²⁷⁵ Halecker S, Surup F, et al. Hymenoseitin, a 3-decalinoyltetramic acid antibiotic from cultures of the ash dieback pathogen, *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Phytochem*. 2014; 100:86–91.

sont avérées être les plus sensibles aux extraits et molécules testés. En revanche très peu d'extraits se sont révélés actifs sur *C. albicans*. Nous avons également pu constater que les composés testés apparaissaient majoritairement plus actifs sur SARM plutôt que sur la souche sensible. Concernant l'activité insecticide, les essais biologiques ont mis en évidence une activité larvicide plutôt qu'adulticide.

L'ensemble des métabolites isolés au cours du projet sont présentés dans les tableaux suivants :

Tableau 10: Molécules isolées à partir de l'extrait AcOEt du champignon *Mucor spp.* SNB-VECD11D

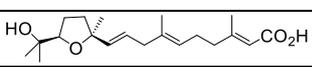
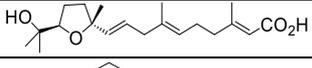
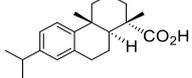
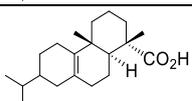
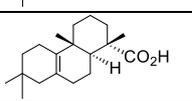
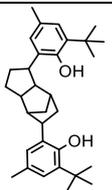
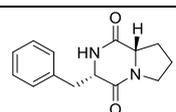
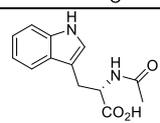
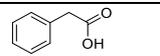
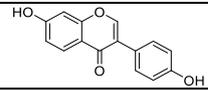
Nom	Molécule	Quantité (mg)	Act. Larvicide (% mortalité à 10 ppm)	S. <i>aureus</i>	MIC (µg/mL)		
					SARM	<i>C. albicans</i>	<i>T. rubrum</i>
Acide mucorinique A		0,4	2,0	16	16	>256	>256
Acide mucorinique B		1,1	2,1	8	16	>256	>256
Acide déhydroabiétique		20,0	65,0	128	64	>256	64
Acide 8-dihydroabiétique		1,5	6,2	16	16	>256	>256
Acide 8-pimarénique		1,0	10,0	16	16	>256	>256
SNB-1		1,3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Tableau 11: Molécules isolées à partir de l'extrait AcOEt du champignon *Mucor spp.* SNB-VECD13A

Nom	Molécule	Quantité (mg)	Act. Larvicide (% mortalité à 10 ppm)	S. <i>aureus</i>	MIC (µg/mL)		
					SARM	<i>C. albicans</i>	<i>T. rubrum</i>
Cyclo(L-Pro-L-Leu)		4,0	4,3	>256	>256	>256	>256
N-Acétyltryptophane		1,7	42,0	n.d	>128	>256	>128
Acide phénylacétique		18,1	24,0	64	64	>128	>128
Daidzéine		0,7	5,9	>256	>256	n.d	>256

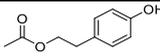
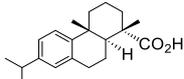
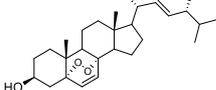
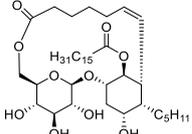
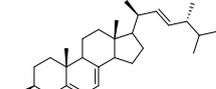
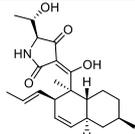
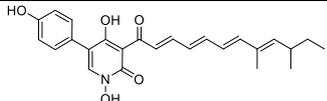
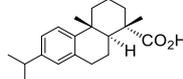
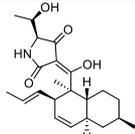
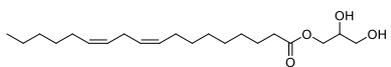
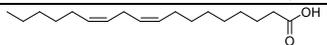
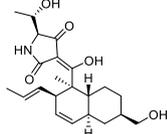
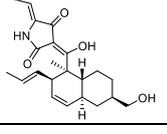
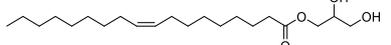
2-(4-Hydroxyphenyl)éthyl acétate		3,3	24,0	>256	>256	>256	>256
Acide déhydroabiétique		20,0	65,0	128	64	>256	64
Ergostérol-5 α ,8 α -peroxide		1,4	54,0	n.d	64	n.d	64
Mucorolactone		4,5	10,0	n.d	>256	>256	>256
Ergosta-5,7,22-triéol		34,4	0	>256	>256	n.d	>256

Tableau 12: Molécules isolées à partir de l'extrait AcOEt du champignon *Isaria farinosa* SNB-CLL10038

Nom	Molécule	Quantité (mg)	Act. Larvicide (% mortalité à 10 ppm)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		<i>C. albicans</i>	<i>T. rubrum</i>
				<i>S. aureus</i>	SARM		
Paécilosétine		31,8	0	2	2	16	16
Farinosone B		0,5	n.d	2	4	n.d	n.d
Acide déhydroabiétique		20,0	65,0	128	64	>256	64
Paécilosétine B		10,7	n.d	32	16	n.d	n.d
Linoléoylglycérol		3,6	n.d	>256	>256	>256	>256
Acide linoléique		28,5	n.d	>256	>256	>256	256
Paécilosétine C		2,4	n.d	>256	>256	n.d	n.d
Paécilosétine D		1,0	n.d	>256	>256	n.d	n.d
Monooléoylglycérol		2,4	n.d	>256	>256	>256	>256

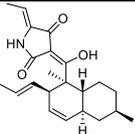
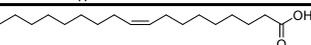
Paécilosétine E		0,4	n.d	>256	128	n.d	n.d
Acide oléique		11,4	n.d	>256	>256	>256	>256

Tableau 13: Molécules isolées à partir de l'extrait AcOEt de la bactérie *Pantoea* spp. SNB-VECD14B

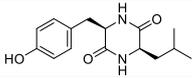
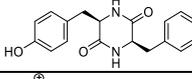
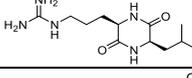
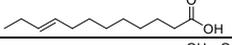
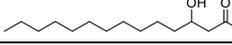
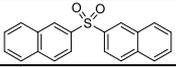
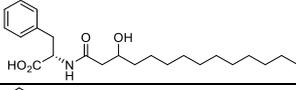
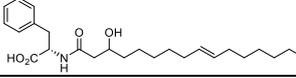
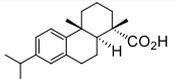
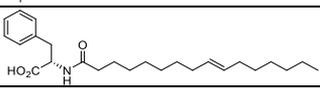
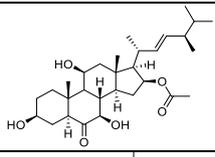
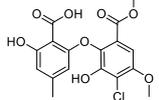
Nom	Molécule	Quantité (mg)	Act. Larvicide (% mortalité à 10 ppm)	MIC (µg/mL)		<i>C. albicans</i>	<i>T. rubrum</i>
				<i>S. aureus</i>	SARM		
Cyclo(L-Leu-L-Tyr)		28,5	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Cyclo(L-Phe-L-Tyr)		13,7	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Cyclo(L-Arg-L-Leu)			n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Acide (E)-dodéc-9-énoïque		4,0	0	n.d	>128	n.d	128
Acide 3-hydroxytétradécanoïque		11,8	26,1	n.d	>128	>128	>128
2,2'-sulfonyldinaphthalène		0,4	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>N</i> -(3-Hydroxytétradécanoyl)phénylalanine		1,9	32,1	>256	64	n.d	n.d
(<i>E</i>)-(3-hydroxyhexadéc-9-enoyl)phénylalanine		1,2	n.d	>256	128	n.d	n.d
Acide déhydroabiétique		20,0	65,0	128	64	>256	64
(<i>E</i>)-hexadéc-9-enoylphénylalanine		10,3	67,3	>256	16	n.d	128

Tableau 14: Molécules isolées à partir de l'extrait AcOEt du champignon *Pestalotiopsis theae* SNB-VECD14E

Nom	Molécule	Quantité (mg)	Act. Larvicide (% mortalité à 10 ppm)	MIC (µg/mL)		<i>C. albicans</i>	<i>T. rubrum</i>
				<i>S. aureus</i>	SARM		
Anicéquol		2,8	3,8	n.d	n.d	n.d	n.d
Dihydromaldoxine		1,3	12,8	n.d	n.d	n.d	n.d

Ainsi en utilisant principalement deux milieux de culture (PDA et MH) nous avons pu isoler une grande diversité de micro-organismes à partir des insectes récoltés. Or on sait que la proportion de micro-organismes isolables en laboratoire ne représente qu'une infime proportion en comparaison de la diversité réellement présente dans un milieu ou une niche particulière. L'explication réside en partie dans la difficulté, voire l'incapacité, à reproduire au laboratoire les conditions environnementales complexes nécessaires au développement de certains micro-organismes. Une autre raison réside en la pousse lente de certaines souches environnementales, qui seraient alors non observables et non isolées car « masquées » par d'autres souches au développement plus rapide. Pour exemple, le développement rapide de certaines souches fongiques a rendu difficile l'isolement des bactéries. En effet, ces dernières étant présentes sous forme de petites colonies, rapidement envahies par les spores fongiques. Afin de palier à cela l'utilisation d'antifongique est à envisager.

Ainsi on ne peut alors qu'imaginer l'importante diversité de micro-organismes non cultivables associées aux insectes récoltés. Seule une analyse de communauté (MISEQ) aurait permis d'avoir une vision globale de la diversité des souches présentes. Elle aurait également pu permettre de mieux comprendre l'évolution des communautés et de dresser des patrons d'exclusion (comparaison d'animaux sains et malades).

Durant l'étude chimique des différentes souches nous avons mis en évidence la production de l'acide déhydroabiétique par plusieurs souches fongiques et bactériennes. Ce résultat est surprenant puisque les acides résiniques sont des métabolites secondaires connus pour être des molécules de défense chez les résineux (pins).^{276,277} Seuls de rares exemples sont retrouvés dans la littérature décrivant leur isolement à partir de micro-organismes.^{278,279,280} Néanmoins il a été démontré dans la littérature que certains micro-organismes, notamment endophytes, étaient capable de synthétiser des métabolites communs ou structurellement proches de leurs plantes hôtes.^{281,282} Il est

²⁷⁶ Phillips MA, Croteau RB. Resin-based defenses in conifers. *Trends Plant Sci.* 1999; 4:184–190.

²⁷⁷ Langenheim JH. Higher-plant terpenoids—a phytocentric overview of their ecological roles. *J Chem Ecol.* 1994; 20:1223–1280.

²⁷⁸ Torres A, Dor I, et al. Characterization of surface n-alkanes and fatty acids of the epiphytic lichen *Xanthoria parietina*, its photobiont a green alga *Trebouxia* sp., and its mycobiont, from the Jerusalem hills. *Eur J Biochem.* 2003; 270:2120–2125.

²⁷⁹ Ayer WA, Macaulay JB. Metabolites of the honey mushroom, *Armillaria mellea*. *Can. J. Chem.* 1987; 65:7–14.

²⁸⁰ Costa MS, Rego A, et al. The conifer biomarkers dehydroabietic and abietic acids are widespread in Cyanobacteria. *Sci rep.* 2016; 6:23436.

²⁸¹ Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect.* 2003; 5:535–544.

donc possible que ce composé, et ses dérivés, aient été acquis par mimétisme métabolique avec des plantes par des organismes entomopathogènes (ou non) vivant au contact de végétaux (saprophytes par exemple).

Bien que l'isolement des composés a été mené selon un principe de fractionnement bio-dirigé, l'étude des extraits et fractions actifs n'a pas nécessairement conduit à l'isolement des molécules responsables de l'activité. Cela a notamment été le cas pour les souches SNB-VECD14E et SNB-CLL10038. L'extrait AcOEt issu de la première souche présentait une forte activité larvicide, que nous n'avons pas retrouvée dans les deux molécules isolées (dihydromaldoxine et anicéquol). La présence de nombreux acide gras dans cet extrait, en proportion importante, pourrait jouer un rôle dans l'activité observée. En effet, de nombreux AG ont été isolés au cours des processus de fractionnements et de purifications des différents extraits de souches. Bien que ces composés puissent être faiblement actifs, voire interférer dans la mesure des activités biologiques, nous n'avons pas poussé l'exploration sur leurs identifications et activités biologiques au cours de ce projet, l'objectif étant de découvrir des composés nouveaux aux structures originales. Dans nos conditions de tests on pourrait se demander si ces derniers ne conduiraient pas à la formation d'un film lipidique à la surface de l'eau lors des essais larvicides, empêchant ainsi les larves de respirer.

Quant à l'extrait issu de la souche d'*I. farinosa*, nous avons pu observer des activités antimicrobiennes mais également larvicides pour certaines fractions. Lors du processus d'isolement, une série d'acide tétramique et des dérivés d'AG ont pu être isolés. Lors des essais, la paécilosétine, composé majoritaire, ainsi que les dérivés d'AG n'ont pas montré d'activité larvicide.

Bien qu'efficace, cette méthodologie n'est donc pas toujours concluante lorsqu'on étudie des mélanges complexe d'extraits naturels ou les activités biologiques observées peuvent être dues à de nombreux paramètres (composés minoritaires, effets synergiques, etc.).

Au cours du projet nous avons également été confrontés au phénomène de perte d'activité survenant après repiquages répétés des souches. Ce fait n'est pas rare puisque

²⁸² Zhang HW, Song YC, et al. Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod rep.* 2006; 23:753–771.

le repiquage successif des souches et leurs cultures sur milieu riche peut entraîner, à plus ou moins long terme, un arrêt de la production de métabolites d'intérêt.²⁶⁶ En effet les cultures pures et le manque de stimulations extérieures (autres organismes, stress nutritif, etc.) peuvent induire une baisse de la production des métabolites secondaires.

Afin d'y remédier, une technique consiste à cultiver le micro-organisme sur différents milieux de culture afin de « stimuler » la souche ou d'effectuer des co-cultures.²²⁸ Il est ainsi possible de moduler la machinerie enzymatique d'un micro-organisme en faisant varier différents paramètres (source de carbone, pH, salinité, luminosité, etc.). La compétition entre micro-organismes peut aussi induire la production de métabolites de défense.²⁶⁶ L'ajout de modificateurs épigénétiques peut également entraîner l'activation de gènes silencieux.²⁸³

Nous avons entrepris une approche OSMAC pour trois souches au cours de ce projet (SNB-VECD15A, SNB-VECD13A et SNB-CLL10038) et n'avons observé de différence au niveau du métabolome que pour la dernière. A noter que cette technique peut être difficile à mettre en place. Elle nécessite souvent de jouer sur de nombreux paramètres et de préparer de nombreux réplicats afin d'obtenir des informations fiables quant à la variabilité métabolique. Lors de la mise en place de co-cultures il n'est pas toujours évident de suivre la production de métabolites, l'attribution à l'une ou l'autre des souches de certaines molécules en culture reste un défi lorsque les métabolites en question ne sont pas produits dans les cultures pures. Des approches métabolomiques sont aujourd'hui mises en place pour faire face à ces difficultés.²⁸⁴ L'observation et l'analyse spécifique des zones de confrontations permet de comparer les cultures entre elles.

De la même manière il apparait lors de l'analyse des résultats d'activité biologique que les champignons entomopathogènes isolés (*Beauveria bassiana* principalement) ne semblent pas produire de métabolites ayant des activités insecticides dans nos conditions de test et de culture. Ces espèces sont pourtant bien décrites et connues pour leurs caractères entomopathogènes. Il se pourrait donc qu'en condition « classique » de

²⁸³ Cichewicz RH. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. *Nat Prod Rep.* 2010, 27:11–22.

²⁸⁴ Bertrand S, Schumpp O, et al. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *J Chromatogr.* 2013; 1292:219–228.

culture ces souches ne soient pas stimulées. L'analyse du réseau moléculaire a pourtant mis en évidence la présence de métabolites insecticides et antimicrobiens. Ces derniers sont certainement produits en faibles quantités. Afin d'augmenter cette production on pourrait envisager de cultiver ces souches sur un milieu additionné de chitine ou de cellules d'insectes comme cela a été effectué pour la souche SNB-VECD15A.

L'activité observée sur larves et spécimens adultes d'*Aedes aegypti* laisse supposer que l'activité pourrait être due à l'ingestion des substances par les larves, et non au contact. Toutefois les tests de toxicité menés ici sont basés sur les protocoles de l'OMS mis en place pour évaluer des molécules pures et non les mélanges complexes que constituent les extraits de micro-organismes. Ainsi lors de la préparation des papiers imprégnés, certains extraits étaient plus difficiles à dissoudre et à répartir uniformément sur les papiers. Or la toxicité dépend du contact des moustiques (au niveau de leurs pattes) avec la substance imprégnée. D'autres essais pourraient donc être envisageables pour s'assurer du contact entre extraits et cuticules. Pour cela il est possible de déposer une goutte de l'extrait à la concentration désirée sur le thorax du moustique préalablement endormi et ainsi d'observer les effets.

Nous pourrions également mener de nouveaux essais sur moustiques adultes par ingestion. Ces essais sont utilisés en routine à l'Institut Pasteur de Guyane et consistent à nourrir les moustiques avec des cotons imbibés de sucrose et de l'échantillon à tester à une concentration donnée. La présence d'un colorant non toxique permet d'observer la bonne prise de repas au niveau de l'estomac de l'insecte. Ainsi nous pourrions constater la toxicité après ingestion. Toutefois la contrainte dans ce test réside dans le fait qu'il ne nous est pas possible de connaître la quantité effective ingérée par le moustique. Cependant, cela pourrait donner des résultats différents et constituer une première approche du mécanisme d'action.

Finalement, il apparaît que l'étude des micro-organismes associés aux insectes représente une source intéressante et unique de métabolites secondaires bioactifs. Il a bien été montré qu'ils étaient capables de biosynthétiser des métabolites insecticides et antimicrobiens. En effet, sur la totalité des 57 micro-organismes, 27 extraits à l'AcOEt (soit 47 %) présentent au moins une activité intéressante (larvicide, antimicrobienne et/ou cytotoxique). Ainsi les micro-organismes associés aux insectes représentent un

potentiel non négligeable de métabolites d'intérêt. Etudier leurs rôles écologiques est indispensable pour une meilleure compréhension des interactions entre organismes et des médiateurs chimiques qui en résultent.

Aujourd'hui il est possible d'accéder à la diversité métabolique « cachée » de ces organismes et d'optimiser la découverte de molécules d'intérêt avec le soutien des nouvelles techniques d'analyses. L'utilisation des réseaux moléculaires n'a été mise en place que tardivement au cours du projet mais s'est révélé être un atout considérable pour la dérégulation et l'exploration d'importants jeux de données.

Partie expérimentale

1 Matériel biologique

1.1 Isolement des micro-organismes associés aux insectes

L'isolement des micro-organismes associés aux insectes récoltés a été effectué au moyen de deux techniques (Figure 57) :

- (A) La cuticule de l'insecte est « grattée » à l'aide d'une anse stérile, puis les micro-organismes sont déposés sur boîte de Petri,

- (B) Une suspension de micro-organismes est préparée en plaçant l'insecte dans de l'eau stérile. La suspension est ensuite diluée et diffusée sur boîte de Petri.

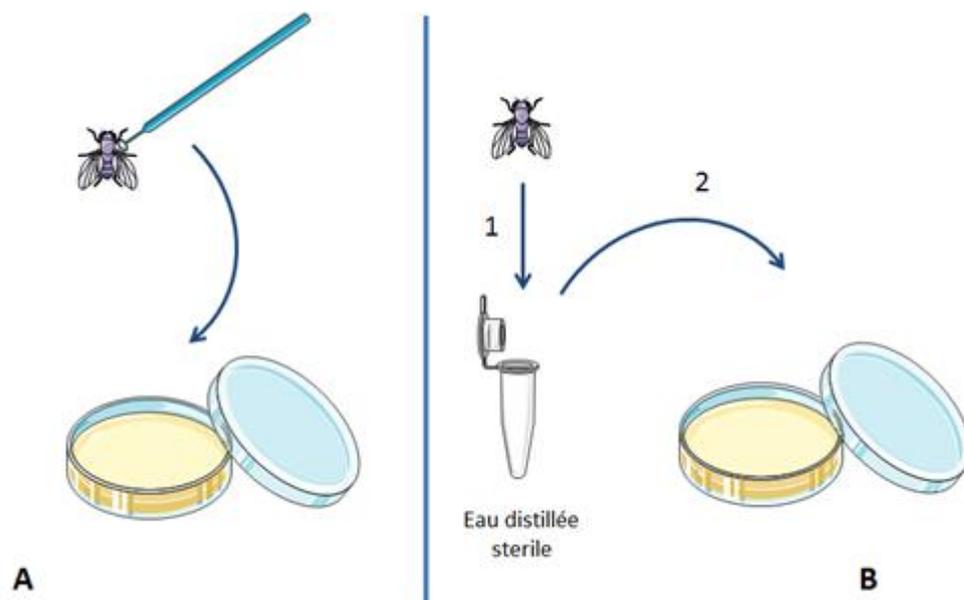


Figure 57: Schéma du protocole utilisé pour isoler les micro-organismes

Les boîtes de Petri sont ensuite laissées à incuber à 28°C, jusqu'à apparition des premières colonies. Ces dernières sont repiquées au fur et à mesure de leur développement individuellement afin d'obtenir des colonies pures. Chaque souche est cryo-conservée en triplicat à -80°C dans un mélange glycérol/eau. L'identification génétique qui est effectuée ensuite permet de confirmer la pureté des souches isolées.

1.2 Identification génétique des micro-organismes

Chaque micro-organisme a été identifié à partir d'un échantillon conservé dans du glycérol. Les identifications ont été sous-traitées à l'entreprise BactUp (<http://bactup.com/>).

Après avoir été extrait et purifié l'ADN génomique est amplifié par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) à l'aide d'amorces ciblant des séquences de gènes spécifiques permettant l'identification des souches microbiennes. Les amorces utilisées sont les suivantes :

- Pour les champignons

ITS1 (5' – TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG – 3') ou ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3')

- Pour les bactéries

16SF1 (5' – CCG TGC AAA GGT AGC ATA AT – 3')

Les séquences ainsi obtenues sont comparées à celles présentes dans la banque de gène NCBI afin d'obtenir un pourcentage de similarité entre les séquences des souches isolées et les séquences répertoriées les plus proches. Deux séquences sont considérées comme similaires lorsque le pourcentage d'homologie est au moins égal à 97,5%.

1.3 Culture « standard » des micro-organismes

Les souches de micro-organismes isolées ont initialement été cultivées sur boîte de Petri (10 boîtes de 10 cm de diamètre) contenant les milieux gélosés Potato Dextrose Agar (PDA) ou Mueller Hinton (MH) selon qu'ils s'agissent de champignons ou de bactéries.

Les milieux sont préparés à partir de préparations « prêt à l'emploi » achetés sous forme poudreuse. Le milieu est alors dissous dans 800 mL d'eau en respectant la concentration de 26,5 g/L pour le milieu PDA et 21 g/L pour le milieu MH. Selon les milieux, de l'agar peut être ajouté à la concentration de 17g/L. Les bouteilles contenant les milieux sont ensuite autoclavées, laissées à refroidir puis coulées dans les boîtes de Petri.

1.4 Cultures utilisées pour la mise en place des méthodes OSMAC

Lors de la mise en place des méthodes OSMAC plusieurs milieux de culture ont été réalisés avec pour objectif de réactiver les voies métaboliques ou augmenter la diversité chimique. Ainsi les différents milieux préparés furent les suivants :

- Milieu PDA ou MH auquel nous avons ajouté du lysat de levure (parois cellulaires de *Sacharomyces cerevisiae*) à différentes concentrations.

- Milieu PDA ou MH additionné de chitine à différentes concentrations.

Le protocole utilisé pour préparer les colloïdes de chitine s'inspire de ceux de la littérature.^{285,286} Ainsi à 10 g de chitine sont progressivement ajoutés 75 ml d'HCl (12 M) sous agitation. Le mélange est placé dans un bain de glace et de l'eau distillée (1 L) est ajouté au milieu sous agitation jusqu'à ce que des particules colloïdales se forment. La préparation est placée au réfrigérateur pendant 12 h puis filtrée et lavée à l'eau. Le solide obtenu est rincé à plusieurs reprises avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH) à pH 12, séché sur papier puis lavé à l'eau jusqu'à l'obtention d'un pH neutre. Le solide est ensuite séché sous pression réduite.

- Milieu PDA ou MH additionné de cellules d'insectes lyophilisées. Il s'agit de cellules de *Drosophila S2*.

- Milieu PDA ou MH additionné de NaCl

- Extrait de Malt. Ce milieu est particulièrement riche en glucide.

- Milieu Czapeck. Il s'agit d'un milieu pauvre, pouvant potentiellement entraîner un stress nutritif chez les souches cultivées et induire la production de métabolites secondaires bioactifs non produits sur milieu riche.

- Co-culture.

²⁸⁵ Hsu SC, Lockwood JL. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of *Actinomycetes* in water and soil. *Appl Microbiol.* 1975; 29:422-426.

²⁸⁶ Murphy N, Bleakley B. Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase-producing microorganisms. *Internet J Microbiol.* 2012; 10.

Nous avons volontairement cultivé la souche d'intérêt avec un autre micro-organisme. L'usage de la co-culture exploite le fait qu'en milieu naturel les micro-organismes sont en constante interaction avec les autres organismes de l'environnement. Ces échanges induisent l'activation de mécanismes de régulation complexes se traduisant par la biosynthèse de métabolites divers.

1.5 Culture à grande échelle des micro-organismes

Afin d'étudier les métabolites secondaires des souches ayant montré de activités biologiques, les micro-organismes sélectionnés sont cultivés à « grande échelle » afin de subir un fractionnement bio-guidé. Ainsi à partir d'une pré-culture du micro-organisme, plusieurs centaines de boites de Petri de 15 cm de diamètre sont ensemencées. Ces cultures sont mises à incuber à 28°C jusqu'à complète colonisation des boites (en moyenne 15 jours pour les champignons, et 5 jours pour les bactéries).

2 Etude chimique des extraits

2.1 Procédure générale

2.1.1 Solvants et réactifs

Les extractions ont été effectuées avec des solvants de pureté 99%. Des solvants de qualité CLHP ont été utilisés pour les purifications (Carlos Elba). L'eau utilisée est de l'eau milliQ filtrée sur un appareil Millipore Synergy®.

2.1.2 Extraits de souches

L'extraction des métabolites secondaires des micro-organismes a été effectuée en par macération du contenu des boites de culture (gélose + micro-organisme) dans un erlenmeyer contenant 250 mL d'acétate d'éthyle. Pour cela le milieu de culture contenant le micro-organisme est découpé en morceaux afin de permettre une meilleure qualité d'extraction dans le solvant. L'erlenmeyer est ensuite placé sous agitation orbitale durant 24h. Puis, le macérât est filtré et lavé à l'eau distillée. La phase organique est récupérée dans une ampoule à décanter et concentrée à l'évaporateur rotatif pour enfin aboutir à un extrait brut.

De la même manière le contenu des boîtes de Petri issu de la culture à grande échelle est découpé puis mis à macérer dans un volume de 5 L d'AcOEt dans une cuve en inox. Afin d'obtenir un rendement maximum, 3 extractions successives sont effectuées à 24, 48 et 72h. Le macérât est ensuite filtré, rincé à l'eau et concentré afin d'obtenir l'extrait brut.

2.1.3 Fractionnement et purifications

2.1.3.1 Chromatographie flash

Le fractionnement des extraits brut a été effectué par chromatographie flash sur un appareil Grace Reveleris. Pour cela l'extrait brut (1 à 3 g en moyenne), est adsorbé sur C18 ou silice selon le mode de fractionnement (phase normale ou phase inverse) afin de constituer un dépôt solide. Le fractionnement est ensuite effectué sur colonne Reveleris C18 (40, 80 ou 120 g) en phase inverse et colonne de silice Grace Flash Cartridges en phase normale.

Les systèmes de solvants utilisés sont les suivants :

- eau/acétonitrile/dichlorométhane/tétrahydrofurane en phase inverse et,
- acétate d'éthyle/méthanol/dichlorométhane en phase normale.

2.1.3.2 Chromatographie liquide haute performance

Les analyses et séparations par chromatographie liquide haute performance ont été réalisées sur une chaîne Gilson® 322 équipée d'un détecteur UV à barrettes de diodes Gilson 171 et d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) prepELSI.

Les colonnes analytiques utilisées sont les suivantes : Phenomenex Luna® C18 (5 µm, 250 × 4,6 mm), Phenomenex Kinetex® C18 (150 × 4,6 mm), Phenomenex Luna® PFP (5 µm, 250 × 4,6 mm) et Phenomenex Luna® C8 (5 µm, 250 × 4,6 mm). Les colonnes préparatives utilisées sont : Phenomenex Luna® C18 (5 µm, 250 × 21,20 mm), Phenomenex Luna® PFP (5 µm, 250 × 21,20 mm), Phenomenex Luna® C8 (5 µm, 250 × 21,20 mm).

En analytique le débit est fixé à 1 mL/min et en préparative à 21 mL/min. les solvants utilisés en HPLC sont l'eau et l'acétonitrile modifiés par ajout d'acide formique à 0,1%.

2.1.3.3 Chromatographie liquide ultra haute performance

Les profils analytiques en UHPLC ont été réalisés sur une chaîne Shimadzu® reliée à deux détecteurs : un détecteur DEDL LT90 et un détecteur UV SPD-M30A. La colonne utilisée est une Phenomenex® Kinetex C18 (1,7 μm , 100A, 150 x 2,10 mm) avec un gradient d'élution eau/ACN tous deux acidifié avec 0,1% d'AF. Les échantillons sont solubilisés dans du méthanol (MeOH) à une concentration de 1 mg/mL puis filtrés avant injection sur des filtres de 0,2 μm . Le débit est de 0,6 mL/min.

2.1.3.4 Chromatographie sur couche mince

Les séparations en CCM analytique ont été réalisées sur des plaques Merck® TLC Silica gel 60 F254 (10 x 5 cm). Les CCM préparatives ont été effectuées sur des plaques Merck® TLC Silica gel 60 F254 (10 x 20 cm). Les plaques sont révélées en UV à 254 et 365 nm ainsi qu'avec un révélateur universel : l'acide phosphomolybdique (Fluka®).

2.1.3.5 Données physiques et spectrales

❖ Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires (α_D) ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre Anton Paar® MCP200. La source lumineuse monochromatique est la raie D du sodium. Les expériences ont été réalisées dans une cuve équipée d'une cellule de 100 mm de longueur de contenance 350 μL à une température de 20°C.

❖ Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur un spectropolarimètre Jasco® J-810 et traités via le logiciel SpectroManager®. Les expériences ont été réalisées dans une cuve en quartz de 1cm, à température ambiante.

❖ Spectrométrie de masse

Les mesures de spectrométrie de masse haute résolution ont été réalisées à l'aide d'un système UHPLC Acquity Waters® équipé d'un détecteur PDA Waters (longueur d'onde mesurée entre 210 et 410 nm). Les échantillons peuvent être injectés en by-pass selon un système d'élution isocratique 50:50 eau/acétonitrile additionnés de 0,1% d'acide formique ou séparés sur une colonne BEH C18 (1,7 μm , 2,1 x 50 mm). Dans ce cas le

système d'élution est un mélange eau/acétonitrile (additionnés de 0,1% d'acide formique), avec le gradient 95:5 à 0:100 en 5,5 minutes. La chaîne est couplée à un spectromètre de masse LCT-Premier XE Waters® muni d'une source électro spray (Electro Spray Ionisation) et équipé d'un analyseur à temps de vol (TOF : Time of flight). Le traitement des données est effectué via le logiciel MassLynx®.

Les analyses UHPLC-MSMS ont été réalisées au Laboratoire de Biologie et Biodiversité Marine (LBBM) de Banyuls sur mer sur un appareil Thermo Ultimate 3000 couplé à un détecteur CAD et une masse triple quadripôle (TQMS) combiné à un Orbitrap (ThermoFisher). L'analyse est réalisée sur une colonne C₁₈ (Accucore Vanquish 50 x 2,1 mm) avec injection d'un volume de 1 µL des échantillons à la concentration de 1 mg/mL. Le système d'élution est composé d'un mélange eau/acétonitrile, tous deux additionné de 0,1% d'acide formique.

D'autres analyses UHPLC-MSMS ont été réalisées à l'Université de Genève au sein du département de phytochimie et de substances naturelles sur un appareil Thermo Dionex Ultimate 3000 couplé à une masse quadripôle-Orbitrap (ThermoFisher). Les analyses ont été réalisées sur une colonne C₁₈ (Acquity 50 x 2,1 mm, 1,7 µm) avec injection de 1 µL des échantillons à la concentration de 4 mg/mL. Le système d'élution est composé d'un mélange eau/acétonitrile, tous deux additionné de 0,1% d'acide formique.

❖ Résonance magnétique nucléaire

Les expériences de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été effectuées sur des appareils Bruker Avance 300, 500 et 600 MHz. Les solvants utilisés sont le méthanol-*d*₄, le chloroforme-*d*, et la pyridine-*d*₅. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (partie par million) et calibrés par rapport au TMS. Les constantes de couplage (*J*) sont exprimées en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est exprimée par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), quint (quintuplet), sext (sextuplet), sept (septuplet) et m (multiplet). L'attribution des signaux protons et des atomes de carbones a été effectuée à partir des expériences 1D ¹H et ¹³C et 2D COSY, HSQC, HMBC, NOESY ou ROESY par traitement des spectres via les logiciels ACD/LABS 12.0® et TopSpin (Bruker).

2.2 Etude par fractionnement bio-guidé de la souche SNB-VECD11D

La souche SNB-VECD11D est un champignon du genre *Mucor* spp. isolé d'une chrysomèle du genre *Acalymma bivittula* récoltée en Guyane Française.

Cette souche a été sélectionnée du fait de son activité larvicide lors du criblage (77% de mortalité à 100 ppm) et de son activité sur *S. aureus* et SARM (CMI respectif de 64 et 16 µg/mL).

Ainsi une première culture à grande échelle du champignon a été réalisée sur milieu gélosé PDA en ensemençant 115 grandes boîtes de Petri. Les cultures ont été extraites par macération dans de l'AcOEt pour aboutir à 2,8 g d'extrait brut après filtration, lavage et séchage. Une portion de l'extrait (2,7 g) a été engagée dans le fractionnement par chromatographie flash pour obtenir 9 fractions, noté FI à FIX (**Figure 58**).

Les fractions ont été testées pour leurs activités larvicides et antimicrobiennes. Les fractions FVI et FVII, les plus actives, ont été analysées par CLHP analytiques et purifiées par CLHP préparative selon les paramètres décrits dans l'article 1 de ce manuscrit.

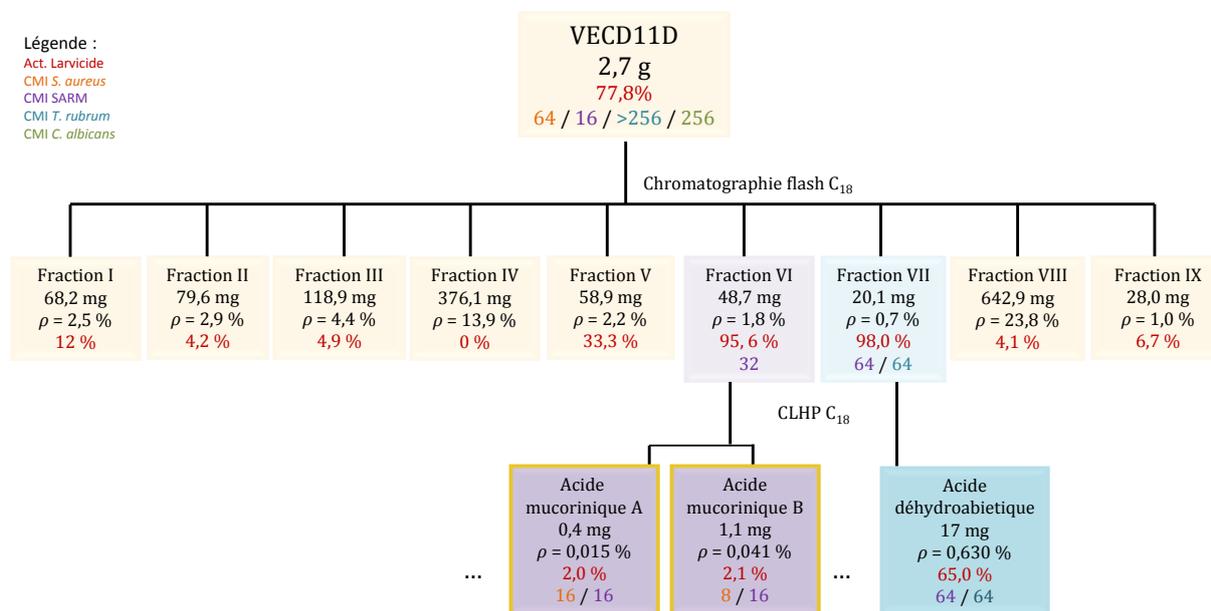


Figure 58: Schéma du premier fractionnement de l'extrait SNB-VECD11D (les composés nouveaux sont encadrés en jaune)

Une seconde culture a néanmoins été nécessaire pour l'étude de la souche SNB-VECD11D, du fait des quantités trop minimes de molécules isolées et la présence de nombreux acide gras rendant difficile la purification des molécules.

Pour cette seconde culture 384 boîtes de Petri ont étéensemencées pour donner 9,59 g d'extrait brut après extraction. Un partage liquide-liquide 50:50 heptane/méthanol-eau (50 :50) a été entrepris sur l'extrait afin d'éliminer les composés très apolaires présent dans l'extrait. Le schéma du fractionnement est présenté ci-dessous (Figure 59).

Après essais nous avons néanmoins constaté une importante baisse des activités biologiques. Les deux extraits ont été analysés sur HPLC et nous avons décidé de fractionner la partition heptane, apparaissant comme étant la plus riche bien que le risque d'isoler des AG était important.

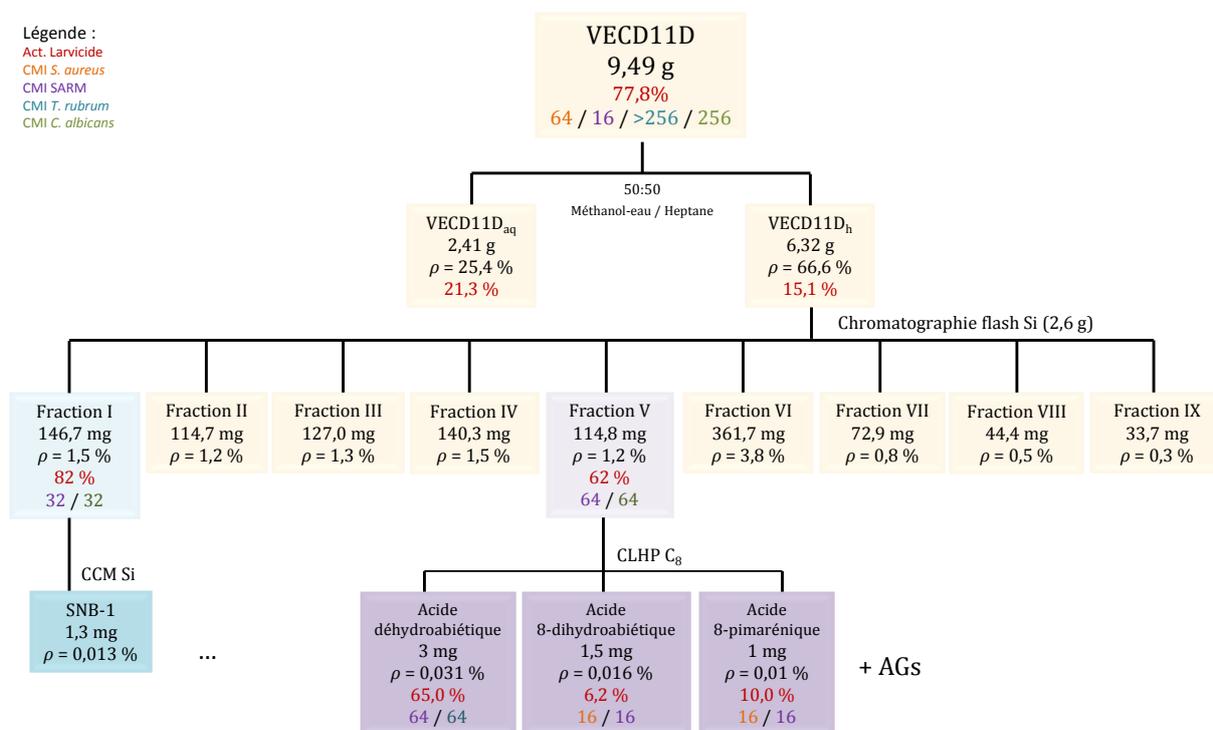


Figure 59: Schéma du second fractionnement de l'extrait SNB-VECD11D

2.3 Etude par fractionnement bio-guidé de la souche SNB-VECD13A

La souche SNB-VECD13A est un autre champignon du genre *Mucor*. Ce dernier a été isolé d'une guêpe de la famille des Vespidae récoltée en Guyane Française.

Nous avons sélectionné cette souche du fait de son activité larvicide (80 % de mortalité à 100 ppm à 24 h). Ainsi pour l'étude de l'extrait, le champignon a été cultivé sur 257 grandes boites de Petri pour donner 2,94 g d'extrait brut.

Une portion de l'extrait (2,8 g) a été engagée dans le fractionnement par chromatographie flash pour obtenir 9 fractions, noté FI à FIX (Figure 60).

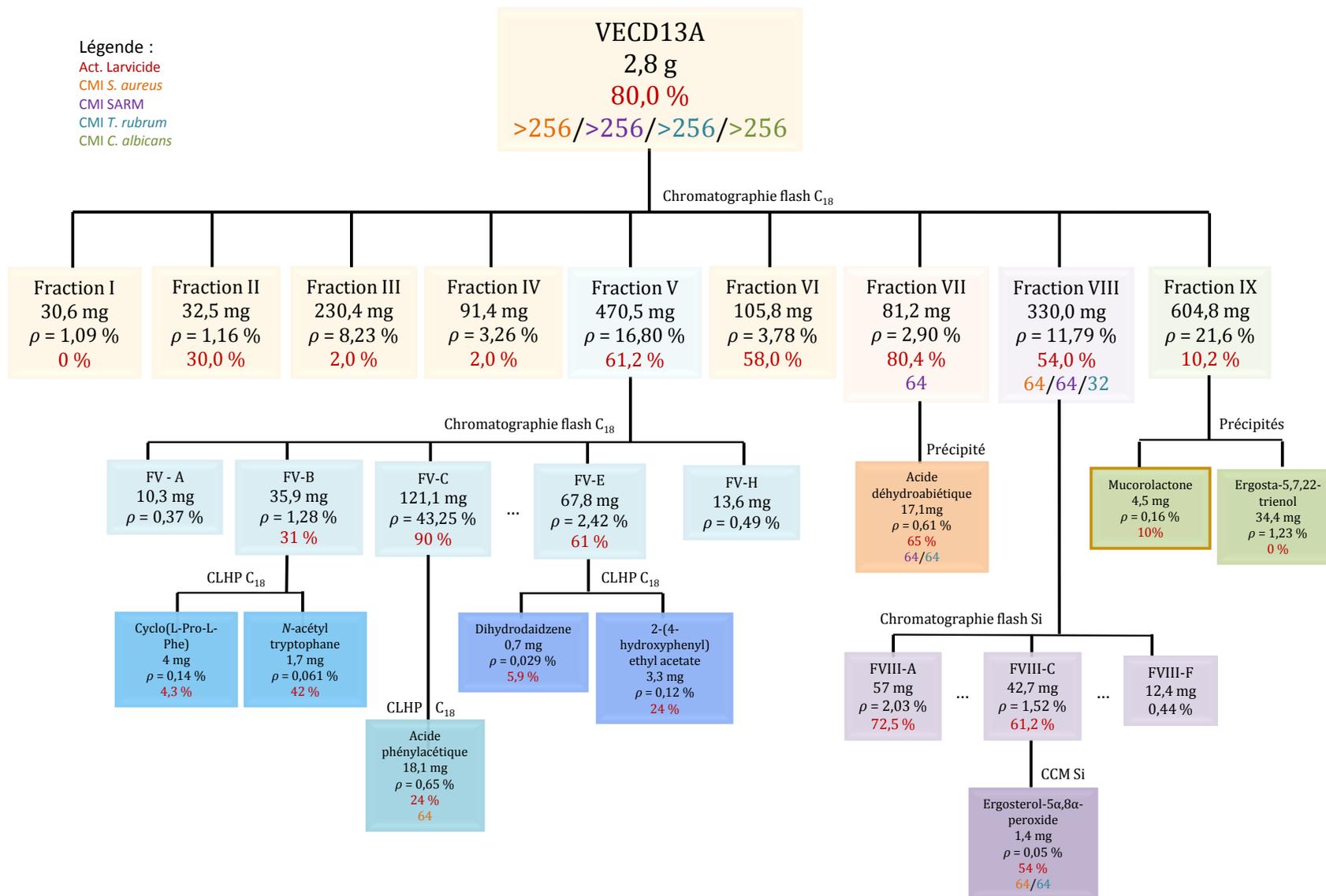


Figure 60: Schéma du fractionnement de l'extrait SNB-VECD13A (les composés nouveaux sont encadrés)

Les processus de purification et les résultats obtenus suite à l'étude de cette souche sont présentés dans l'article 2 de ce manuscrit.

2.4 Etude par fractionnement bio-guidé de la souche SNB-CLL10038

La souche SNB-CLL10038 est un champignon du genre *Isaria farinosa*, isolé d'une larve non identifiée. Cette souche, transmise par C. Lechat, a été sélectionné du fait de son activité antimicrobienne sur les pathogènes SARM, *C. albicans* et *T. rubrum* avec des CMI respectifs de 32, 64 et 32 µg/mL.

Une culture à grande échelle sur 148 grandes boîtes de Petri a été réalisée sur milieu PDA afin d'obtenir 3,34 g d'extrait brut. Un fractionnement par chromatographie flash sur C₁₈ a ensuite été réalisé sur 3 g d'extrait. Nous avons ainsi pu obtenir 8 fractions, notées FI à FVIII (Figure 61).

Colonne : Reveleris C₁₈, 120 g, débit : 80 mL/min – **Gradient** : eau/ACN (95:5 à 0:1 (35 min), THF/DCM 1:1 à 0:1 (15 min)).

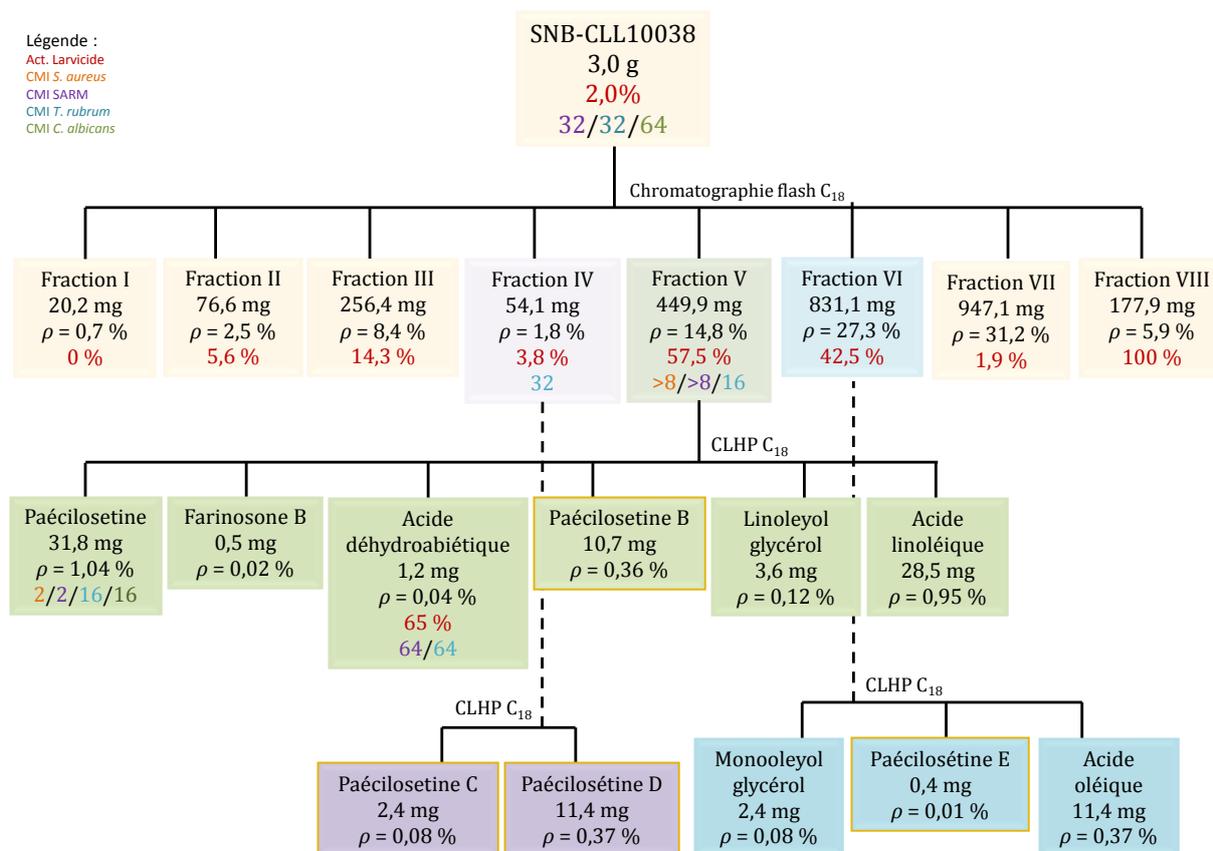


Figure 61: Schéma du fractionnement de l'extrait SNB-CLL10038 (les composés nouveaux sont encadrés)

2.5 Etude par fractionnement bio-guidé de la souche SNB-VECD14B

La souche SNB-VECD14B est une bactérie du genre *Pantoea* spp. isolée d'un insecte de la famille des Diaspididae, également récoltée en Guyane Française.

Cette souche a été sélectionnée principalement du fait de son activité larvicide lors du criblage (97,2 % de mortalité à 100 ppm) et pour son activité sur *T. rubrum* (CMI de 16 µg/mL).

Une culture à grande échelle de la bactérie a été réalisée sur milieu gélosé MH en ensemençant 176 grandes boîtes de Petri. Les cultures ont été extraites selon le même protocole que précédemment pour obtenir 2,48 g d'extrait brut.

Une portion de l'extrait (2,4 g) a été engagée dans le fractionnement par chromatographie flash pour obtenir 8 fractions, notées FI à FVIII (Figure 62).

Colonne : Reveleris C₁₈, 120 g, débit : 80 mL/min – **Gradient** : eau/ACN (95:5 à 0:1 (25 min), THF/DCM 1:1 à 0:1 (11 min)).

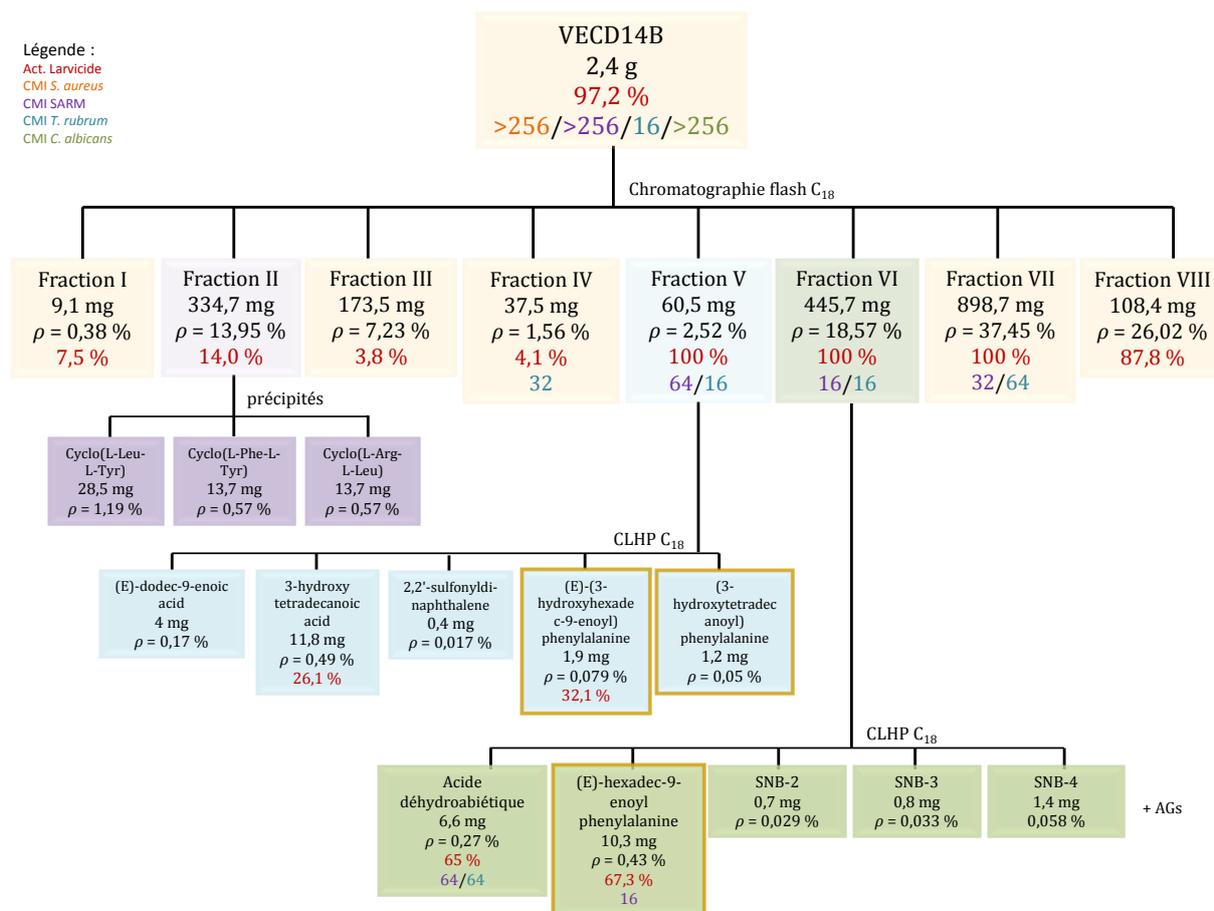


Figure 62: Schéma du fractionnement de l'extrait SNB-VECD14B (les composés nouveaux sont encadrés)

Les résultats obtenus suite à l'étude de cette souche sont présentés dans la publication 2 de ce manuscrit.

2.6 Etude par fractionnement bio-guidé de la souche SNB-VECD14E

La souche SNB-VECD14E a été cultivée à grande échelle sur un milieu gélosé solide Potato Dextrose Agar (PDA). La culture est maintenue durant 15 jours en salle de culture à 28°C puis extraite par macération dans de l'acétate d'éthyle. Après filtration et lavage à l'eau, la phase organique est séchée pour obtenir 2,6g d'extrait brut. 1g a été engagé dans le fractionnement par chromatographie flash sur colonne C18 pour obtenir 8 fractions, noté FI à FVIII (Figure 63).

Colonne: Reveleris C₁₈ 40 g, débit : 40 mL/min, **gradient:** eau/acétonitrile 95:5 à 0:1 (16 min), tétrahydrofurane/dichlorométhane 1:1 à 0:1 (6 min).

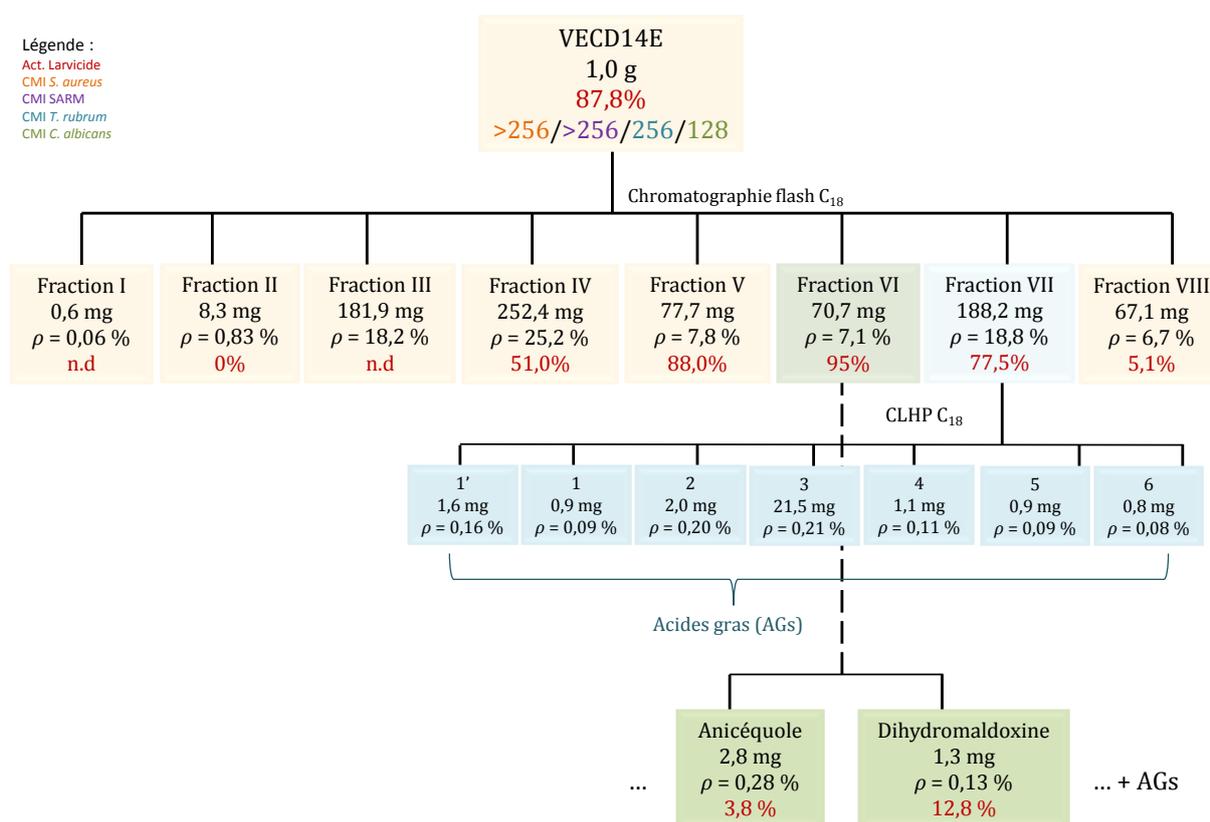


Figure 63: Schéma du fractionnement de l'extrait SNB-VECD14E suivant l'activité larvicide (exprimée en pourcentage de mortalité à 100 ppm pour le brut et les fractions, 10 ppm pour les molécules)

2.7 Etude par fractionnement bio-guidé de la souche SNB-VECD15A

La bactérie SNB-VECD15A a été sélectionnée lors du criblage pour son activité larvicide (75,5 % mortalité). La souche a donc été cultivée à grande échelle sur 250 boîtes de Petri et extraite à l'AcOEt ce qui a permis d'obtenir 2,46 g d'extrait.

Une méthode OSMAC a été mise en place pour cette souche également afin de relancer la production de métabolites secondaires. La souche a ainsi été cultivée sur sept différents milieux (Tableau 15).

Tableau 15: Milieux de culture utilisés pour réactiver les voies de biosynthèse chez *Asaia* sp.

Milieux de culture	Additifs
MH gélosé	1 g extrait de levure
	2 g extrait de levure
	5 g extrait de levure
	1 g chitine (colloïde)
	2 g chitine (colloïde)
	5 g chitine (colloïde)
	0,7 g cellules de drosophile lyophilisées

N.B. L'ensemble des rendements indiqués dans les schémas de fractionnements des différentes souches étudiées ont été calculés à partir de la masse de l'extrait brut obtenu.

2.8 Préparation des « Metal Organic Frameworks » (MOFs)

Lors de nos expériences nous avons préparé les éponges à base de $\{[(ZnI_2)_3(\text{tris}(4\text{-pyridyl})\text{-}1,3,5\text{-triazene})_2]_x(\text{CHCl}_3)_n\}$ en adaptant le protocole initiale de Fujita.²¹⁹ Pour cela nous avons fait réagir de la triazine (8,5 mg) dissout dans 4 mL de chloroforme avec de l'iodure de zinc (ZnI_2) dans le méthanol (Figure 64).

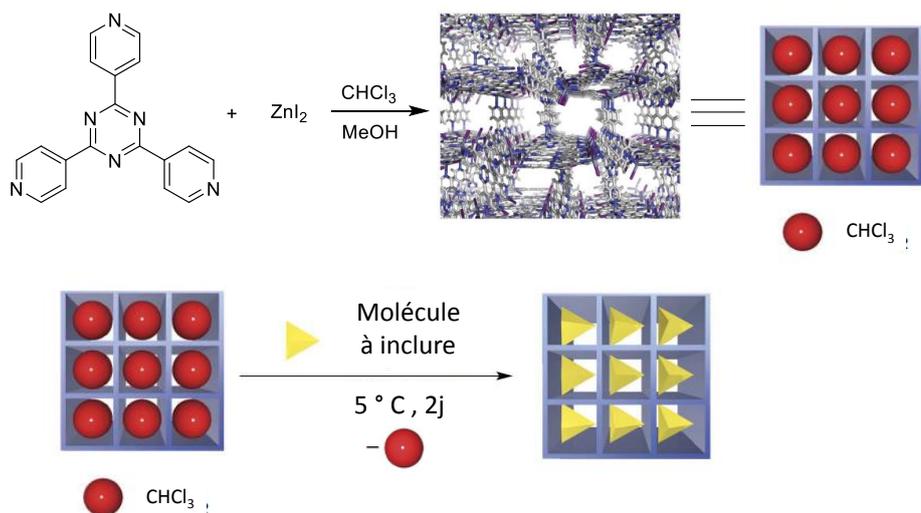


Figure 64: Etape de préparation et d'inclusion des molécules dans les éponges cristallines (Adapté de Fujita et al. 2013)²¹⁹

Les premiers cristaux sont observables à l'interface des deux phases ($CHCl_3$ - $MeOH$) au bout de quelques jours. Ils sont transférés délicatement dans un autre tube et nous procédons à une étape d'échange de solvant, en les « rinçant » pour n'avoir que du chloroforme dans les cavités.

Une étape de sélection des cristaux est nécessaire pour n'utiliser que ceux de meilleures qualités. Pour cela ils sont triés au microscope électronique (Figure 65).

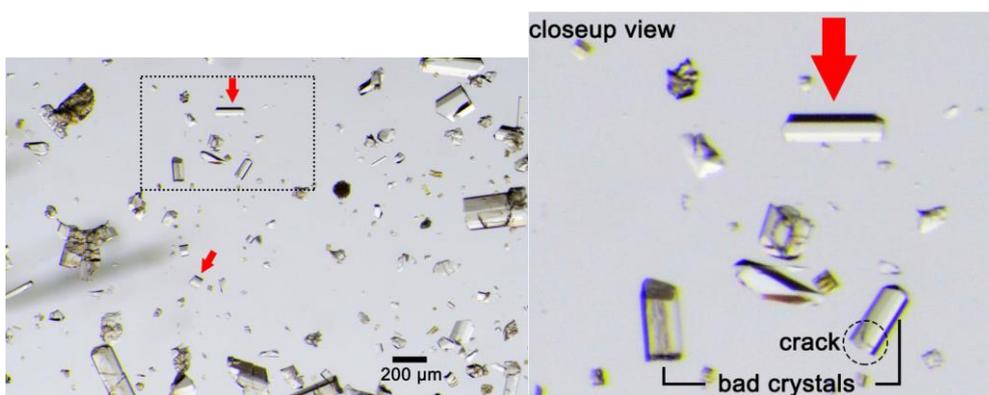


Figure 65: Photographie de cristaux de haute et de basse qualité observés au microscope²¹⁹

2.9 Réactions d'hémisynthèses

Dérivatisation avec le chlorure de bromobenzoyl :

(1) La mucorolactone (1 mg, 1,3 μmol) et le chlorure de bromobenzoyl (27 mg, 0,12 mmol) sont dissous dans de la pyridine (200 μL). Le mélange réactionnel est laissé à température ambiante pendant 24h, puis arrêté par ajout d'une solution saturée de bicarbonate de sodium. Une extraction est effectuée à l'acétate d'éthyle, suivi d'un lavage par une solution de HCL 1N puis d'une solution saturée de bicarbonate de sodium. La phase organique est ensuite séchée sur Na_2SO_4 et évaporée à sec.

(2) La mucorolactone (0,7 mg) et le chlorure de bromobenzoyl (4,5 mg, 0,02 mmol) sont dissous dans du dichlorométhane anhydre (1 mL). La triéthylamine (1 mL) est ajoutée au mélange réactionnel ainsi que du DMAP (1 mg). Au bout de 24h la réaction est arrêtée par ajout d'une solution saturée de bicarbonate de sodium puis extraite au dichlorométhane.

Hydrolyse des esters :

(1) La mucorolactone (1 mg) est dissout dans une solution de THF anhydre (2 mL) à laquelle est ajouté du LiOH (18 mg) préalablement dissout dans de l'eau (0,2 mL). Le mélange réactionnel est laissé à température ambiante pendant 24h. La réaction est arrêtée par une solution de HCL 1M et extraite deux fois à l'AcOEt. La phase organique est ensuite séchée sur Na_2SO_4 et évaporée à sec. Le produit obtenu est purifié sur HPLC.

(2) La mucorolactone (1 mg) est dissout dans une solution de THF anhydre (1 mL). La solution est placée dans de la glace puis du LiAlH_4 est ajouté goutte à goutte sous agitation. Le mélange réactionnel est laissé 2h puis la réaction est arrêtée par une solution de Na_2SiO_4 ajouté goutte à goutte. Le mélange réactionnel est laissé à température ambiante durant 24h puis filtré et évaporée à sec. Le produit obtenu est purifié sur HPLC.

3 Essais biologiques

3.1 Essais antimicrobiens

3.1.1 Pathogènes

Afin de déterminer l'activité antimicrobienne des extraits de micro-organismes, un criblage biologique est effectué sur plusieurs pathogènes humains. Parmi les souches pathogènes dont nous disposons au laboratoire, nous avons sélectionné deux bactéries, une levure ainsi qu'un champignon dermatophyte : *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* (Tableau 16).

Les pathogènes sont conservés au laboratoire dans une étuve à 37°C. Les souches sont régulièrement repiquées (toutes les deux semaines) dans des tubes contenant des milieux inclinés : MH pour les bactéries, Sabouraud pour les champignons et levures.

Tableau 16: Identification des souches pathogènes utilisées

		Provenance	Code	Référence GenBank
Bactéries	<i>S. aureus</i>	ATCC	29213	
	SARM	ATCC	33591	
Levure	<i>C. albicans</i>	ATCC	10231	
Champignon filamenteux	<i>T. rubrum</i>	Isolat clinique	SNB-CN1	KC692746

3.1.2 Mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par microdilution

Les tests de micro-dilution sont réalisés afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de nos extraits sur les différents pathogènes microbiens (Figure 66). Les essais sont réalisés selon les protocoles de référence établis par l'EUCAST pour les tests de susceptibilité antibactérienne et antifongique.^{287,288}

Ce test permet d'évaluer la sensibilité d'un organisme face à un agent antimicrobien en déterminant la plus petite concentration d'agent permettant d'inhiber la croissance de l'organisme. La gamme de concentrations testées s'étend de 256 à 8 µg/mL pour le criblage biologique.

²⁸⁷ EUCAST. EUCAST DISCUSSION DOCUMENT E.Dis 5.1 Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiol Infect.* 2003; 9:1–7.

²⁸⁸ EUCAST. EUCAST definitive document EDef 7.1 Method for the Determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clinical Microbiol Infect.* 2008; 14:398–405.

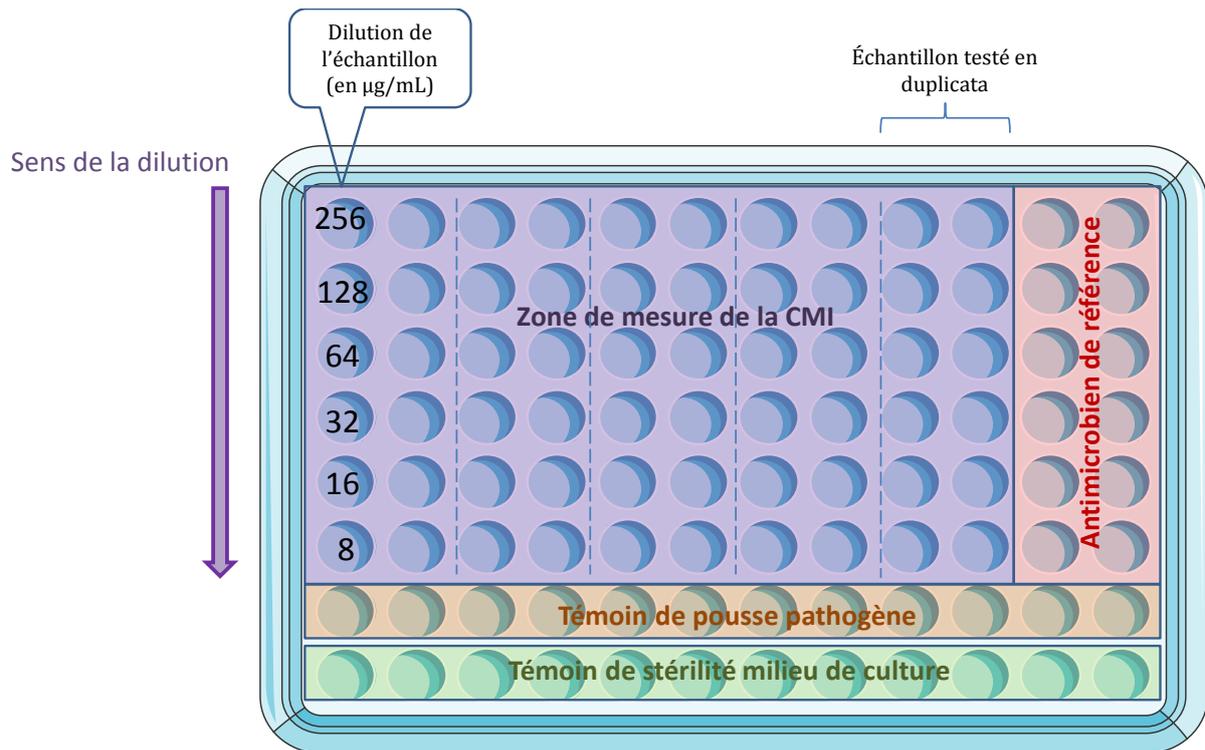


Figure 66: Plan de plaque 96 puits pour la détermination des CMI par micro-dilution

Les tests s'effectuent en utilisant les milieux RPMI et Mueller Hinton (liquide) respectivement pour les champignons et les bactéries. La préparation du milieu RPMI nécessite de le tamponner au préalable par une solution de MOPS (acide 3-(N-morpholino)-propane sulfonique) à une concentration de 0,165 mol/L afin d'atteindre un pH neutre. La solution est ensuite filtrée sur une membrane polyéthersulfone (0,22 µm).

Sur une plaque de 96 puits, 100 µL de milieu de culture sont déposés dans chaque puit, 90 µL supplémentaire sont ajoutés dans la première ligne puis 10 µL de l'échantillon à tester (solution stock à 10,24 mg/mL dans DMSO) pour un volume total de 200 µL dans la première ligne. Des dilutions en cascade au demi sont alors effectuées de la première à la dernière ligne afin de couvrir l'ensemble de la gamme de concentrations.

Ensuite 100 µL d'une suspension de pathogènes sont ajoutés dans l'ensemble des puits, de la première à la septième ligne. La septième ligne correspond au témoin de pousse du pathogène et la dernière ligne correspond au témoin de stérilité du milieu de culture.

Lors du test chaque échantillon est testé en duplicata. La CMI d'un témoin positif est également évalué en testant un antibiotique/antifongique de référence en duplicata également (Figure 66 - Tableau 17).

Tableau 17: CMI des composés de références utilisés (témoins positifs)

	<i>S. aureus</i>	SARM	<i>C. albicans</i>	<i>T. rubrum</i>
Oxacilline	0,5			
Vancomycine		1		
Fluconazole				4,0
Itraconazole			4,0	

La lecture des tests s'effectue à 24h pour les bactéries, 48h pour les levures et 5 jours pour les champignons.

3.1.2.1 Préparations des solutions stocks d'échantillons

Les échantillons testés (extraits bruts pour le criblage biologique, fractions pour le fractionnement bio-guidé et molécules) sont préparés à la concentration de 10,24 mg/mL dans du DMSO. Cette solution stock est utilisée pour effectuer les dilutions en cascade lors du test.

Pour éviter toute toxicité sur les cellules microbiennes, le volume de DMSO dans chaque puit ne doit pas excéder 5% du volume totale (200 µL), soit 10 µL.

La concentration désirée dans les premiers puits est de 256 µg/mL, ainsi la concentration initiale d'échantillon avant l'ajout d'inoculum doit être deux fois plus élevée, soit 512 µg/mL. La concentration C_1 de la solution stock d'échantillon est donc calculée ainsi :

$$\begin{aligned}C_1 \times V_1 &= C_2 \times V_2 \\C_1 \times 10\mu\text{L} &= 512 \mu\text{g/mL} \times 200 \mu\text{L} \\ \text{Soit } C_1 &= 10,24 \text{ mg/mL}\end{aligned}$$

3.1.2.2 Préparations des solutions stocks d'antimicrobiens

Comme pour les échantillons, les solutions d'antibiotiques et d'antifongiques sont déposées à 10 µL.

Les solutions stock d'oxacilline et d'itraconazole sont préparées à 0,32 mg/mL (pour une gamme de concentration allant de 16 à 0,5 µg/mL), la vancomycine est préparée à 0,64 mg/mL (pour une gamme de concentration allant de 32 à 1 µg/mL), le fluconazole est préparé à 1,28 mg/mL (pour une gamme de concentration allant de 64 à 2 µg/mL).

3.1.2.3 Préparations des solutions de pathogènes

Les solutions mères de pathogènes sont préparées par mise en suspension d'une colonie (pour les bactéries ou levures) ou d'un morceau de mycélium (pour les champignons) dans de l'eau distillée stérile. La suspension est ajustée pour atteindre une densité optique de 0,5 McFarland (correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/mL). Elle est ensuite diluée dans le milieu de culture dans une proportion de 1:10 (v/v) pour les champignons, 1:100 pour les bactéries, 1:1000 pour les levures.

3.2 Evaluation biologique de l'activité insecticide

3.2.1 Essais larvicide

Les essais réalisés sur larves d'*Aedes aegypti* sont adaptés des protocoles recommandés par l'OMS pour l'évaluation de larvicides²⁸⁹ et les tests en tubes développés dans le cadre de criblage de nouvelles molécules.²⁹⁰

Les œufs nécessaires à l'élevage des larves sont fournis par l'Institut Pasteur de Guyane (IPG). Les essais sont effectués sur les lignées sensibles PAEA et NEW ORLEANS originaire de Polynésie et de Nouvelle Orléans, élevées depuis plusieurs années à l'IPG. Ces lignées de référence sont sensibles à tout insecticide.

3.2.1.1 Elevage

Les femelles *Aedes aegypti* pondent leurs œufs sur un support solide à proximité de point d'eau. L'éclosion se produit lorsque les œufs se retrouvent immergés. Ainsi les œufs d'*Aedes* sont résistants à la dessiccation et peuvent persister plusieurs mois avant l'éclosion (**Figure 67**).

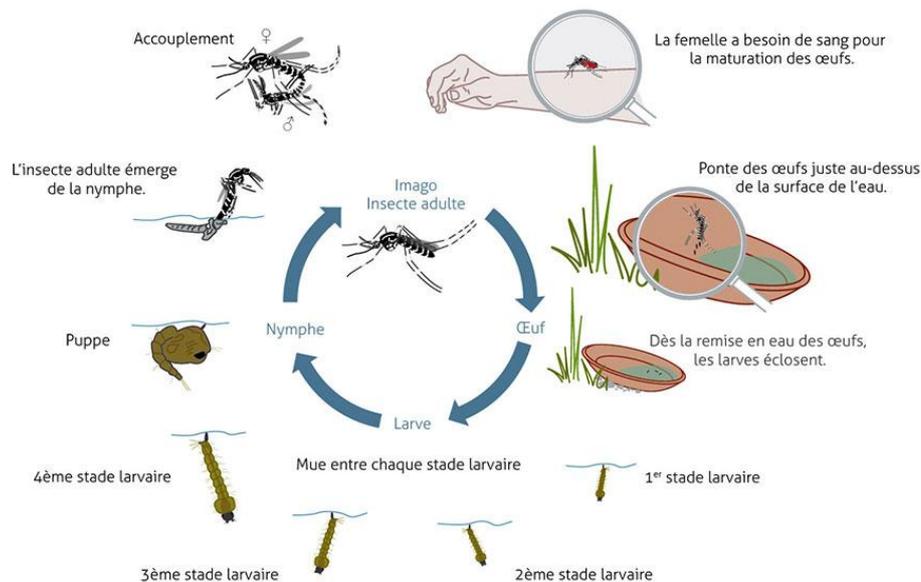
Pour permettre la ponte, des morceaux de buvard sont placés dans les cages d'élevage à proximité de point d'eau. Les buvards sont régulièrement récoltés lorsqu'ils sont « pleins » d'œufs et stockés selon le besoin.

Pour obtenir une nouvelle génération de larves, des morceaux de buvard séchés sont immergés et placés sous une cloche à vide pendant 1 à 2 heures afin de permettre l'éclosion synchronisée des œufs de moustiques. Les larves obtenues sont ensuite

²⁸⁹ World Health Organization, 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicide. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13, 39 p.

²⁹⁰ Falkowski M, Jahn-Oyac A, et al. Assessment of A Simple Compound-Saving Method To Study Insecticidal Activity of Natural Extracts and Pure Compounds Against Mosquito Larvae. *J Am Mosq Control Assoc.* 2016; 32:337–340.

réparties équitablement dans plusieurs bacs contenant de l'eau distillée et de la nourriture (levure de bière). Elles sont ensuite maintenues en salle chaude à 28 °C selon une photopériode de 10h de lumière et 14h d'obscurité le temps nécessaire pour atteindre la fin du 3ème stade de croissance larvaire (environ 5 jours) utilisé pour les tests.



© Biogenz, I. Schliep

Figure 67: Cycle de vie du moustique *Aedes aegypti*

3.2.1.2 Tests en pot

Les tests en pot sont réalisés en quadruplicat, à raison de 25 larves par pot, pour un total de 100 larves par extrait brut testé. Le contrôle négatif est effectué de la même manière. Chaque pot contient 99 mL d'eau distillé auquel est ajouté 1 mL d'extrait brut à la concentration de 10 mg/mL (dilué dans l'éthanol ou de l'acétone) pour atteindre une concentration finale de 100 µg/mL dans chaque pot. Le témoin négatif est effectué en ajoutant 1 mL d'éthanol ou d'acétone dans chaque pot. La lecture de la mortalité s'effectue à 24h.

3.2.1.3 Tests en tube

Les tests en tube ont été développés plus tardivement au cours de la thèse afin de pallier à la trop grande quantité d'extrait nécessaire à la mise en place des tests en pot. Ainsi les

fractions et les molécules obtenues suite au fractionnement bio-guidé ont été testées en tube (**Tableau 18**).

Fractions. Dans 29,7 mL d'eau distillée, 0,3 mL de la fraction à une concentration de 10 mg/mL sont ajoutés pour une concentration finale dans le pot de 100 µg/mL. La solution est ensuite répartie dans 10 tubes à hémolyses à raison de 3 mL par tube. Dans chaque tube 5 larves sont transférées (soit 50 larves par fraction testée).

Molécules. Pour les molécules, un volume de 0,3 mL à une concentration de 1 mg/mL est ajouté au pot contenant 29,7 mL d'eau stérile. Ainsi, on obtient une concentration finale de 10 µg/mL dans le pot, réparti dans 10 tubes à hémolyse.

Tableau 18: Préparations des échantillons pour les tests larvicide

Tests en pot (extraits bruts)				
Solution stock		Aliquot (mL)	Concentration finale dans 100mL	
mg/mL	PPM		µg/mL	PPM
10	10000	1	100	100
Tests en tube (fractions)				
Solution stock		Aliquot (mL)	Concentration finale dans 30mL	
mg/mL	PPM		µg/mL	PPM
10	10000	0,3	100	100
Tests en tube (molécules)				
Solution stock		Aliquot (mL)	Concentration finale dans 30mL	
mg/mL	PPM		µg/mL	PPM
1	1000	0,3	10	10

3.2.2 Essais sur moustiques adultes

Les essais sur moustiques adultes ont été effectués en Guyane, d'avril à mai 2016, au sein de l'unité de « Contrôle et Adaptation des vecteurs » au sein du vectopole amazonien « Emile Abonnenc » de l'IPG.

3.2.2.1 Elevage des moustiques

Après éclosion des œufs de moustiques, les larves sont maintenues en bac d'eau distillé et élevées jusqu'à l'obtention de nymphes. Durant la croissance des larves, ces dernières sont nourries avec de la levure de bière. L'eau des bacs est régulièrement changée afin de garder l'eau claire. Dès lors que les nymphes apparaissent, elles sont triées, isolées dans un éclosoir et placées dans une cage d'élevage. Des mèches de coton imbibées de sucrose

à 10% placées dans des fioles sont introduites dans les cages d'élevage pour nourrir les moustiques émergents.

Lorsque dans une cage les individus atteignent l'âge de 3 à 5 jours, ils sont prêts pour les tests. Pour cela un tri est nécessaire pour ne sélectionner que les individus femelles (responsables des piqûres). Ainsi les moustiques sont placés dans un congélateur durant quelques minutes pour provoquer un état de « dormance » puis triés sur des bacs de glace afin de séparer les individus mâles des femelles.

3.2.2.2 Préparation des papiers imprégnés d'extraits

Les tests sur papier filtre de l'OMS utilisent du papier filtre Whatman imprégné de substance active diluée dans un mélange acétone/huile de silicone. La concentration de la solution est calculée en fonction du poids de matière active dans le volume de silicone exprimée en pourcentage (g/100 mL).

Les calculs nécessaires à la préparation des solutions sont présentés dans le **Tableau 19** suivant :

Tableau 19: Préparation des solutions d'imprégnation

	mg	mL d'acétone	cm2	%	
	3,6		1		
	648	1,3	180	100	
	0,648	1,3	180	0,1	
	6,48	1,3		1	par papier
	64,8	13			pour 10 papiers
papier imprégné à 1%	soit une concentration finale de			4,9846	mg/mL
Imprégnation des papiers					
Nom de l'insecticide	DELTAMETHRINE		1,00%	Date:	10-mars-16
Réf. de l'insecticide				opérateur:	Seindé
Réf. du Lot		exp. Date:			
Masse de MA affichée	20	mg			
degré de pureté	100	%			
Masse de MA réelle	20	mg			
volume d'acétone de reconstitution	2,50	mL			
Concentration Solution Mère	8	mg/mL			
concentration désirée	4,9846	mg/mL			
Solution d'imprégnation F1					
Volume de Solution Mère à prélever	2,430	mL			
Volume d'acétone à compléter	1,470	mL			
Volume final de F1	3,9	mL			
Nombre de papier	2	(calculé pour 3)			
Solution Fille F1	3,9	mL			
Huile de silicone	2,1	mL			
Volume finale	6	mL			

Après préparation de la solution, les papiers Whatman (12 x 15 cm) sont placés à plat sur une planche cloutée et 2 mL de la solution est appliquée de façon homogène, goutte à

goutte, à l'aide d'une pipette en verre. Les papiers sont laissés à sécher durant 24h avant utilisation.

Les papiers contrôles sont préparés de la même manière avec uniquement de l'acétone et de la silicone.

3.2.2.3 Tests de toxicité

Les essais réalisés sont des tests en tube ayant pour but d'évaluer le niveau de sensibilité des moustiques adultes face à un insecticide (ou de mesurer leur niveau de résistance). Les résultats s'expriment en pourcentage de mortalité après 24 heures. Selon le mode d'action de la substance testée, l'effet Knock-Down (effet KD) est également mesuré au cours de l'heure d'exposition.

Une série de 6 tubes est préparé pour chaque série de test. L'extrait brut est testé en quadruplicat, les deux tubes restants sont utilisés pour les contrôles négatif et positif (Figure 68).



Figure 68: Matériel nécessaire à la mise en place des essais de toxicité sur moustiques adultes (© Nausicaa H.)

Des papiers imprégnés d'extraits brut à 1% sont insérés dans 4 tubes de tests, un papier imprégné de solvant est inséré dans le contrôle négatif et un papier imprégné d'insecticide (deltaméthrine) à 0,055% est utilisé pour le contrôle positif.

Les moustiques femelles sont aspirés et transférés dans chaque tube, à raison de 25 individus par tube et mis en contact durant une heure avec la substance active. Le nombre de moustique KD est comptabilisé aux intervalles : 3, 6, 10, 15, 20, 30, 40, 50 et 60 minutes. A la fin de la période d'exposition les moustiques sont placés en tube d'observation. Après 24h le nombre de moustiques mort est comptabilisé.

Pour que le test soit validé la mortalité dans les tubes témoins doit être inférieure à 20%. Si celle-ci est comprise entre 5 et 20%, la mortalité est corrigée selon la formule d'Abbott.²⁹¹

3.2.2.4 Tests d'irritabilité

Les essais d'irritabilité ont pour but d'évaluer l'effet des extraits sur le comportement des moustiques, et leur éventuel caractère excito-répulsif.

Les essais sont effectués dans un système composé de deux chambres séparées par une trappe (Figure 69). Un papier imprégné de substance active est inséré dans la chambre de test, et l'autre chambre reste vide (chambre clair). Cette dernière est recouverte de papier feutré noir ainsi que les fenêtres d'observations présentes de chaque côté des unités.²⁹²

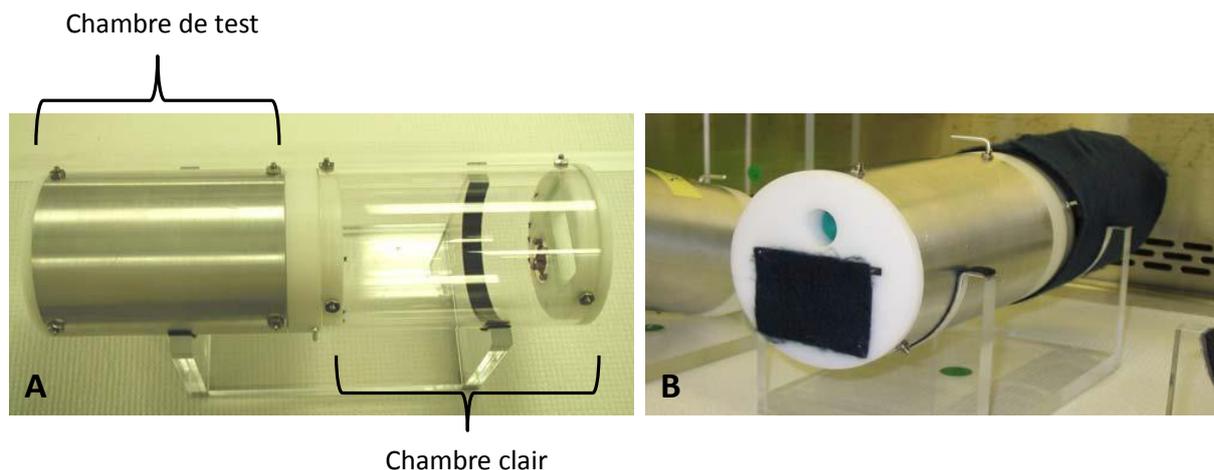


Figure 69: Montage du système pour les tests d'irritations. A: non couvert ; B: système couvert prêt à l'emploi²⁹³

Lorsque le montage est complet, 10 moustiques femelles sont introduits dans la chambre de test. Après 30 secondes de mise en contact avec le papier imprégné, la trappe séparant les deux unités est ouverte durant 10 minutes puis refermée. Les moustiques présents dans chaque chambre sont alors comptabilisés ainsi que les effets KD.

²⁹¹ Abott WJ. *Econ. Entomol.* 1925; 18: 265–267.

²⁹² Grieco JP, Achee NL, et al. A novel high throughput screening system to evaluate the behavioral response of adult mosquito to chemicals. *J Am Mosq Contr Assoc.* 2005; 21:404–411.

²⁹³ Achee NL. Behavior modifying compounds for disease vector control. 2007.

3.3 Evaluation de l'activité cytotoxique

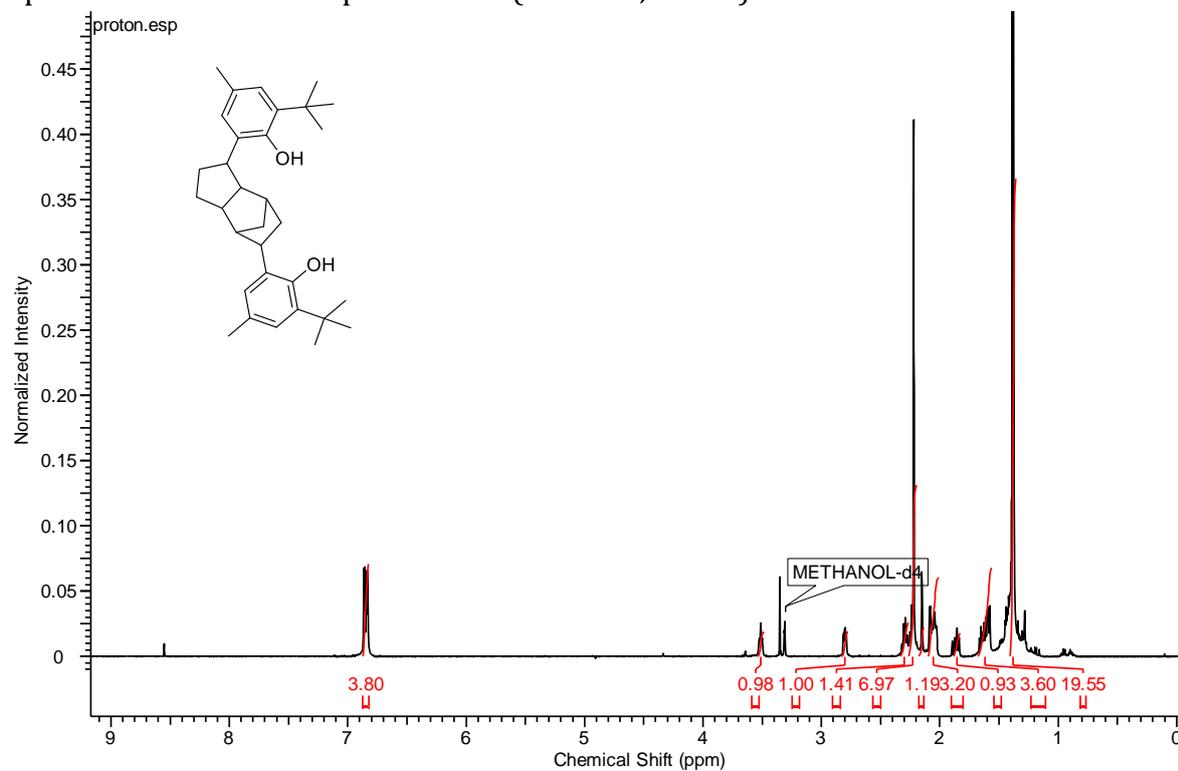
Les essais de cytotoxicité ont été effectués selon la méthode décrite par Tempête et al.²⁹⁴ On détermine le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire sur 3 lignées : KB (cellules de carcinome du col utérin), MRC5 (cellules saine de poumon fœtale humain) et MDA 231 (cellules de mélanome). Les échantillons sont testés à la concentration de 1 et 10 µg/mL dans du DMSO.

²⁹⁴ Tempête C, Werner G, et al. In vitro cytostatic activity of 9-demethoxyprothramycin B. *Eur J Med Chem.* 1995; 30:647–650.

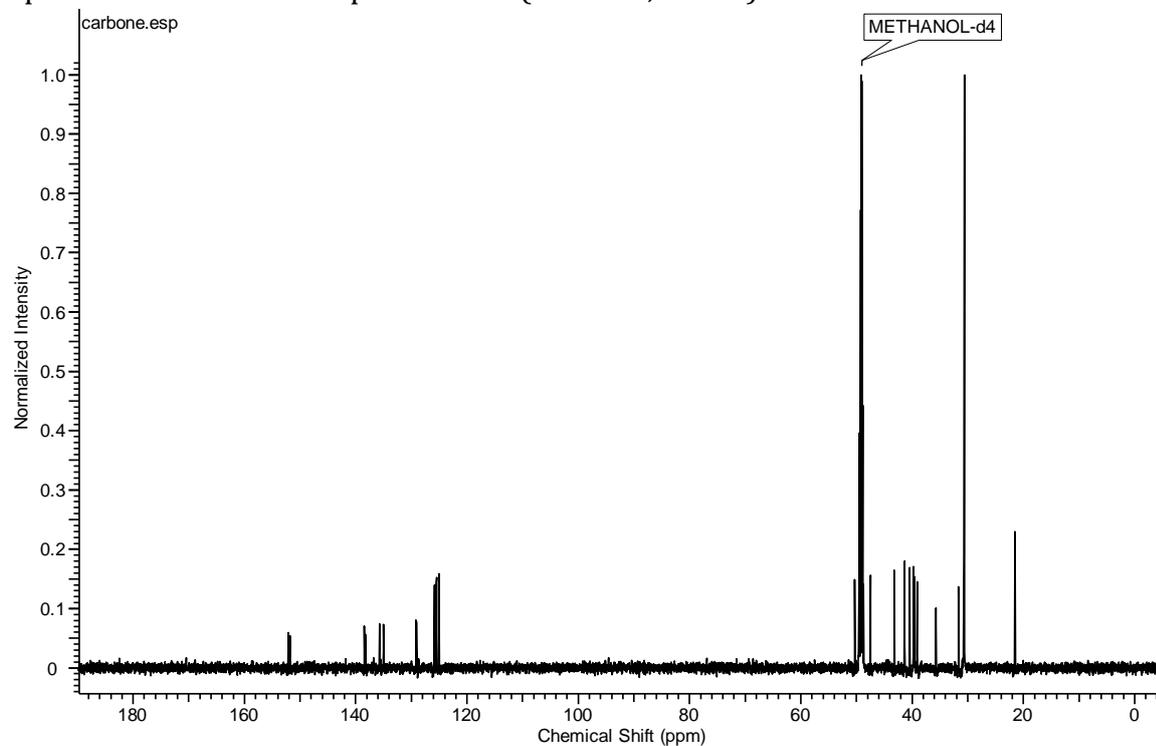
Annexes

ANNEXES de la partie 3 : *Mucor* spp. SNB-VECD11D

Spectre RMN ^1H du composé SNB-1 (600MHz, MeOD)



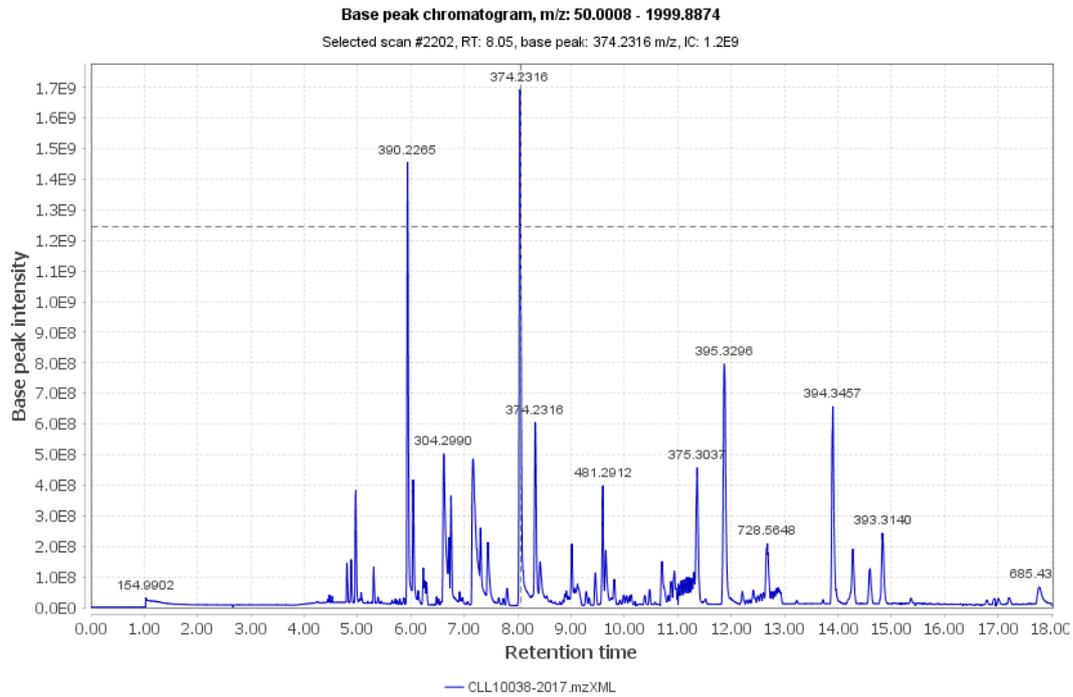
Spectre RMN ^{13}C du composé SNB-1 (125MHz, MeOD)



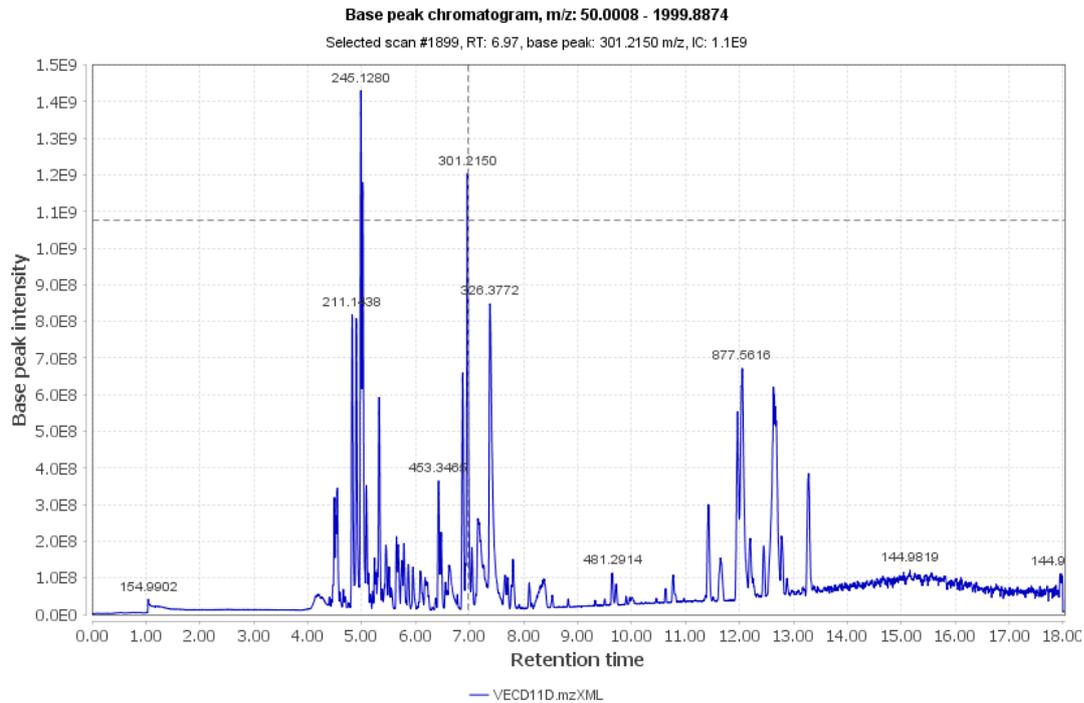
ANNEXES de la partie 4 : *Isaria farinosa* SNB-CLL10038

Chromatogramme des extraits OSMAC obtenus pour *Isaria farinosa*

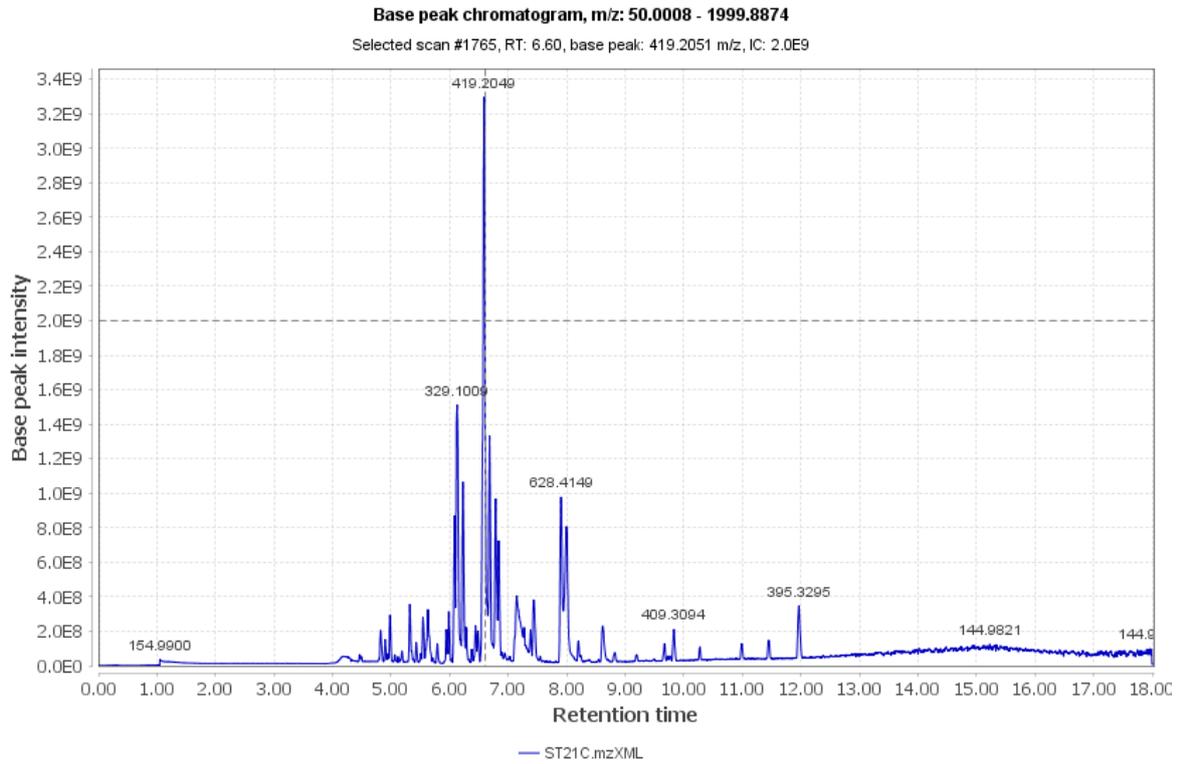
SNB-CLL10038 sur milieu PDA



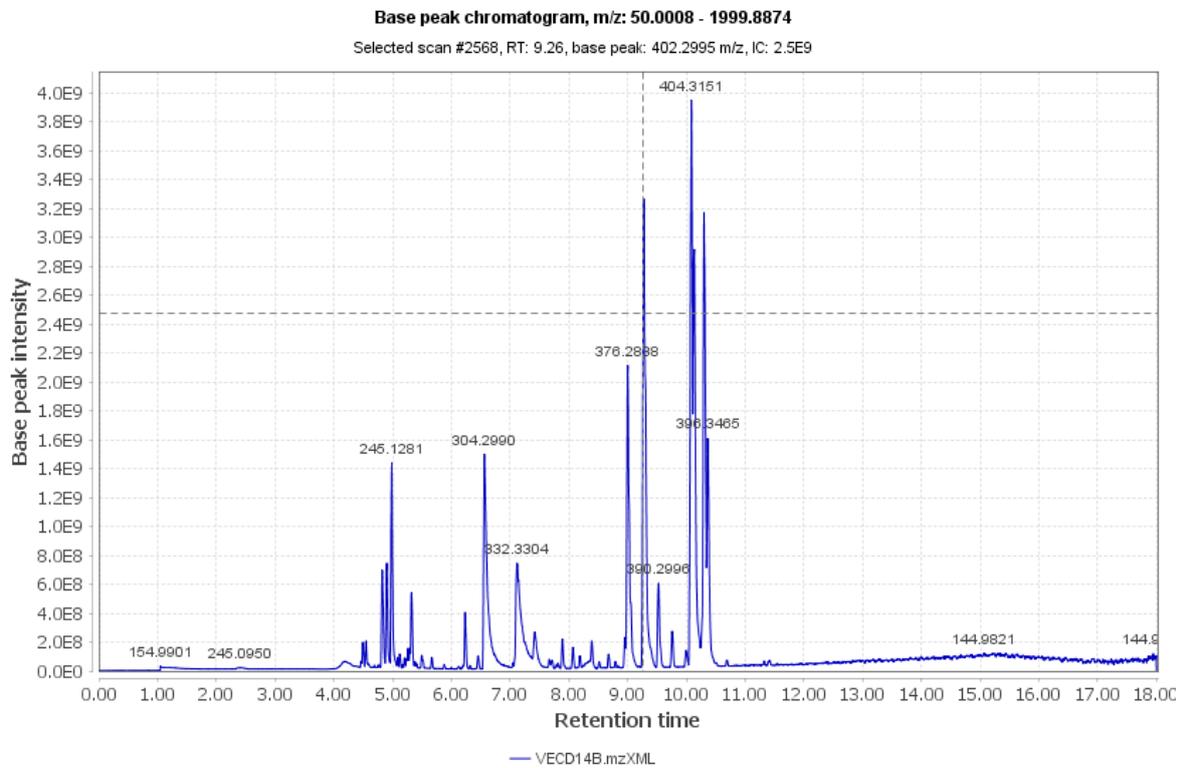
SNB-VECD11D sur milieu PDA



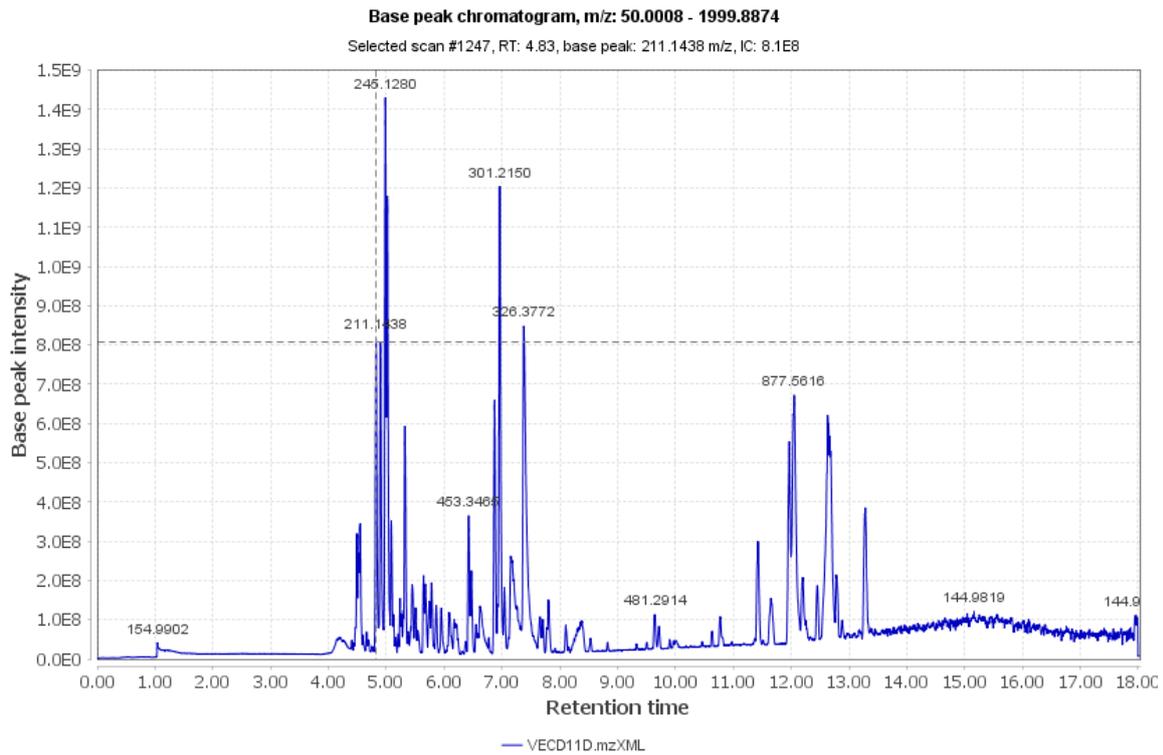
SNB-ST21C sur milieu PDA



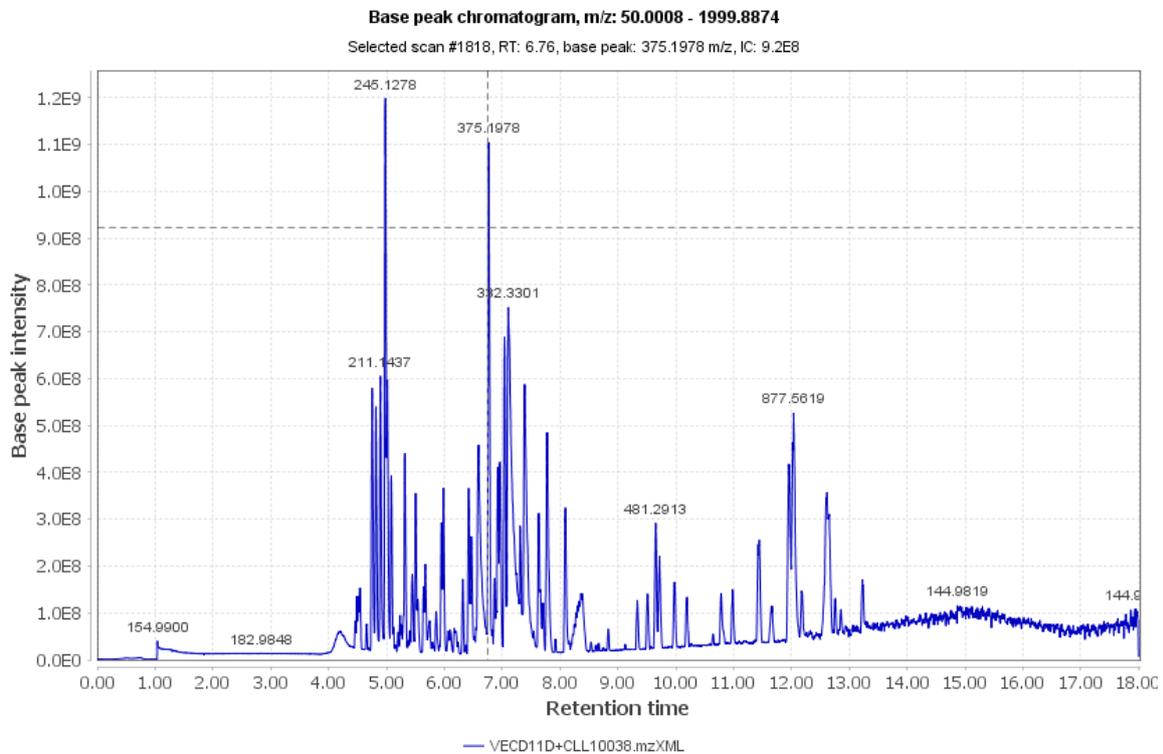
SNB-VECD14B sur milieu PDA



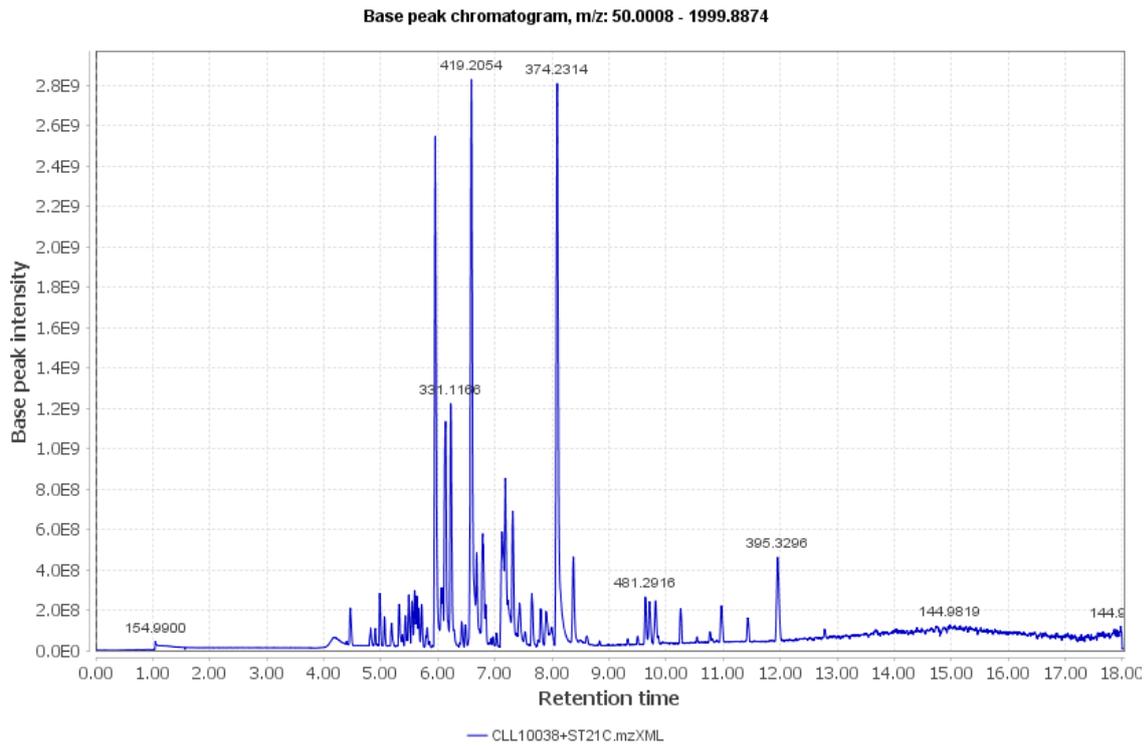
SNB-VECD13A sur milieu PDA



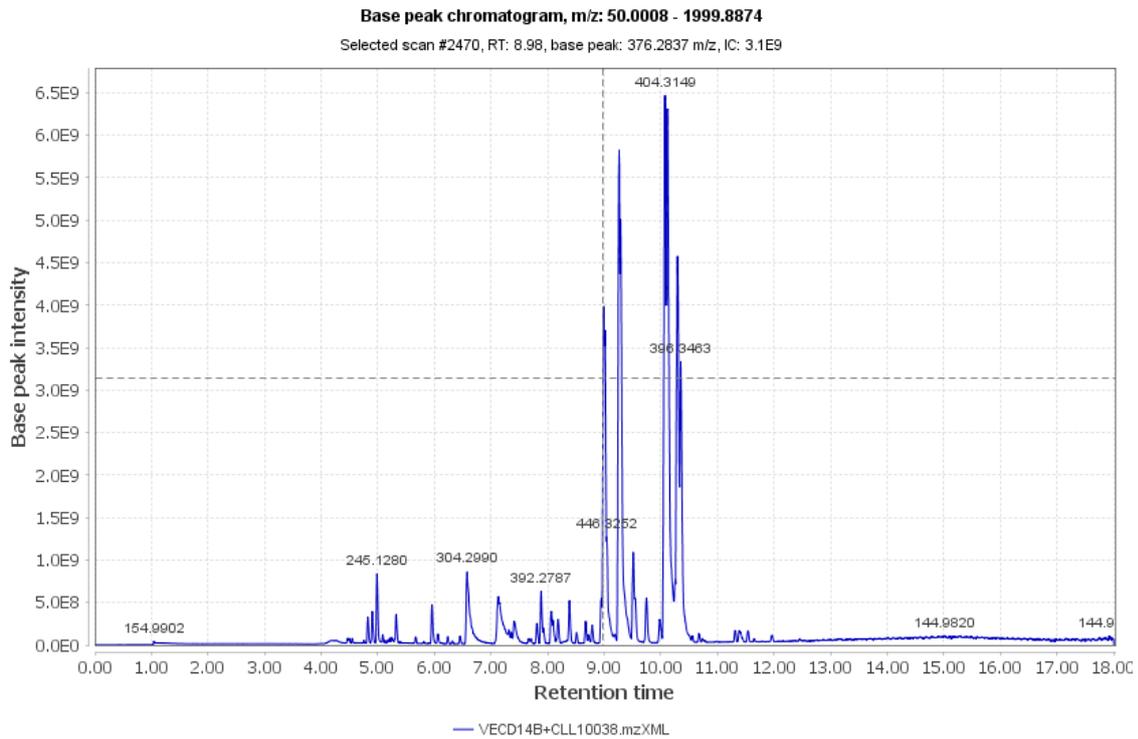
Co-culture SNB-CLL10038 / SNB-VECD11D sur milieu PDA



Co-culture SNB-CLL10038 / SNB-ST21C sur milieu PDA



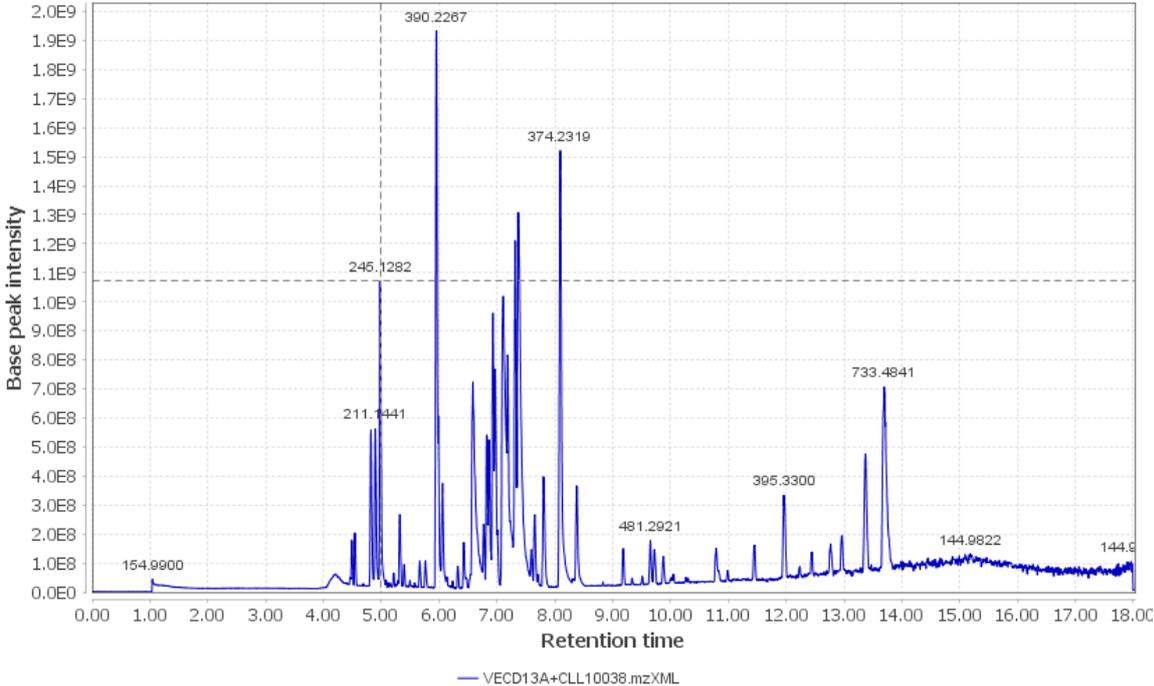
Co-culture SNB-CLL10038 / SNB-VECD14B sur milieu PDA



Co-culture SNB-CLL10038 / SNB-VECD13A sur milieu PDA

Base peak chromatogram, m/z: 50.0008 - 1999.8874

Selected scan #1255, RT: 4.98, base peak: 245.1282 m/z, IC: 1.1E9



ANNEXES de la partie 5 : *Pantoea* spp. SNB-VECD14B

Données physiques et spectrales relatives au dicétopipérazines

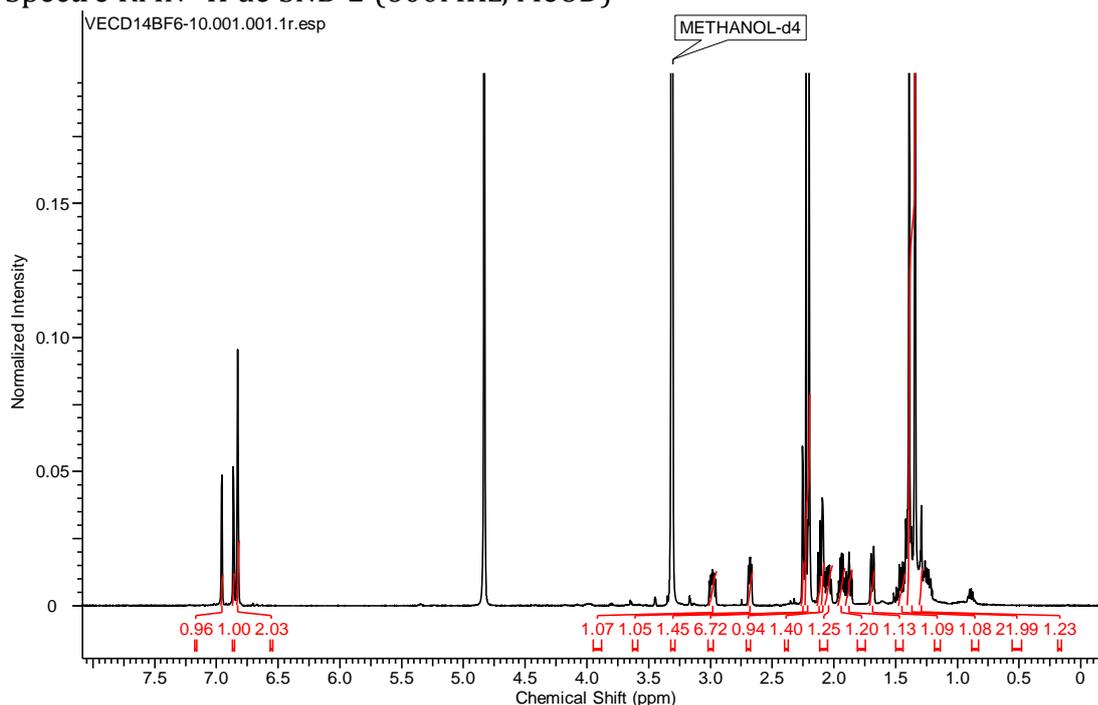
Cyclo(L-Tyr-L-Leu) : ^1H NMR (500 MHz, Pyr) δ 11,41 (1H, s, OH), 9,29 (1H, s, NH), 9,19 (1H, s, NH), 7,41 (2H, d, $J = 8,4$ Hz), 7,10 (2H, d, $J = 8,4$), 4,65 (1H, m), 4,17 (1H, m), 3,57 (1H, dd, $J = 13,6 ; 5,2$), 3,26 (1H, dd, $J = 13,7 ; 4,1$), 1,68 (2H, m), 1,02 (1H, m), 0,92 (3H, d, $J = 6,7$ Hz), 0,90 (3H, d, $J = 6,6$). ^{13}C NMR (75 MHz, Pyr) δ 169,3 (C), 168,1 (C), 158,6 (C), 132,6 (CH), 127,5 (C), 116,6 (CH), 57,9 (CH), 54,3 (CH), 45,4 (CH₂), 40,5 (CH₂), 24,6 (CH), 23,7 (CH₃), 21,7 (CH₃). HRESITOFMS [M+H]⁺ m/z 277.1555 (calc C₁₅H₂₁N₂O₃, 277.1547).

Cyclo(L-Tyr-L-Phe) : ^1H NMR (500 MHz, Pyr) δ 9,20 (1H, s, NH), 9,15 (1H, s, NH), 7,39 (2H, d, $J = 7,2$ Hz), 7,32 (2H, d, $J = 8,5$), 7,27 (1H, t, $J = 7,5$), 7,20 (1H, t, $J = 7,4$), 7,15 (1H, t, $J = 8,5$), 4,51 (2H, m), 3,32 (1H, dd, $J = 13,4 ; 3,7$), 3,24 (1H, dd, $J = 13,6 ; 3,7$), 2,72 (1H, dd, $J = 13,6 ; 7,3$), 2,67 (1H, dd, $J = 13,6 ; 8,1$). ^{13}C NMR (75 MHz, Pyr) δ 167,9 (C), 167,8 (C), 158,5 (C), 138,1 (C), 132,4 (CH), 131,0 (CH), 129,3 (CH), 127,9 (C), 127,5 (CH), 116,8 (CH), 58,1 (CH), 57,9 (CH), 41,9 (CH₂), 41,1 (CH₂). HRESITOFMS [M+H]⁺ m/z 311.1385 (calc C₁₈H₁₉N₂O₃, 311.1390).

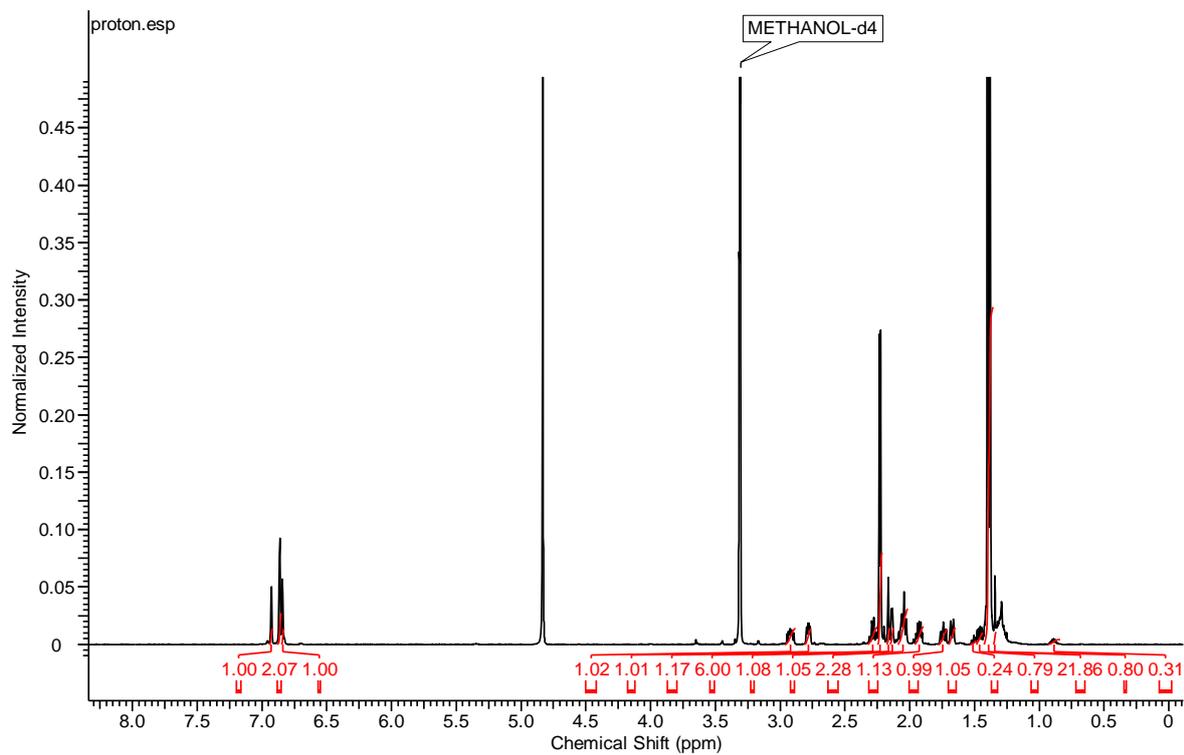
Cyclo(L-Arg-L-Leu) : ^1H NMR (500 MHz, Pyr) δ 9,45 (1H, NH), 8,9 (1H, NH), 7,0 (1H, NH), 4,23 (1H, m), 4,22 (1H, m), 3,61 (1H, m), 3,49 (1H, m), 2,33 (1H, m), 2,25 (2H, m), 2,16 (1H, m), 1,80 (1H, m), 1,70 (1H, m), 1,65 (1H, m), 0,94 (3H, m), 0,95 (3H, m). ^{13}C NMR (75 MHz, Pyr) δ 171,3 (C), 167,5 (C), 59,9 (CH), 54,3 (CH), 46,0 (CH₂), 39,5 (CH₂), 28,9 (CH₂), 25,4 (CH), 23,5 (CH₂), 23,5 (CH₃), 22,3 (CH₃).

Données physiques et spectrales relatives aux composés SNB-2 à SNB-4

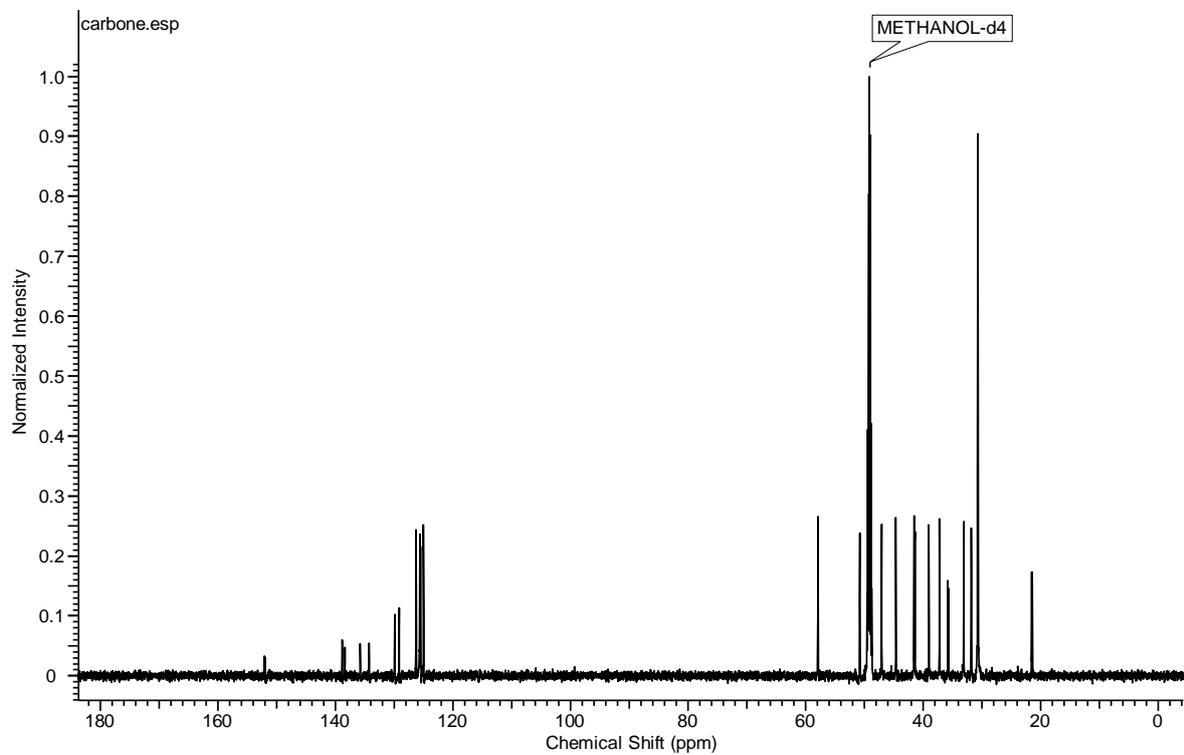
Spectre RMN ^1H de SNB-2 (600MHz, MeOD)



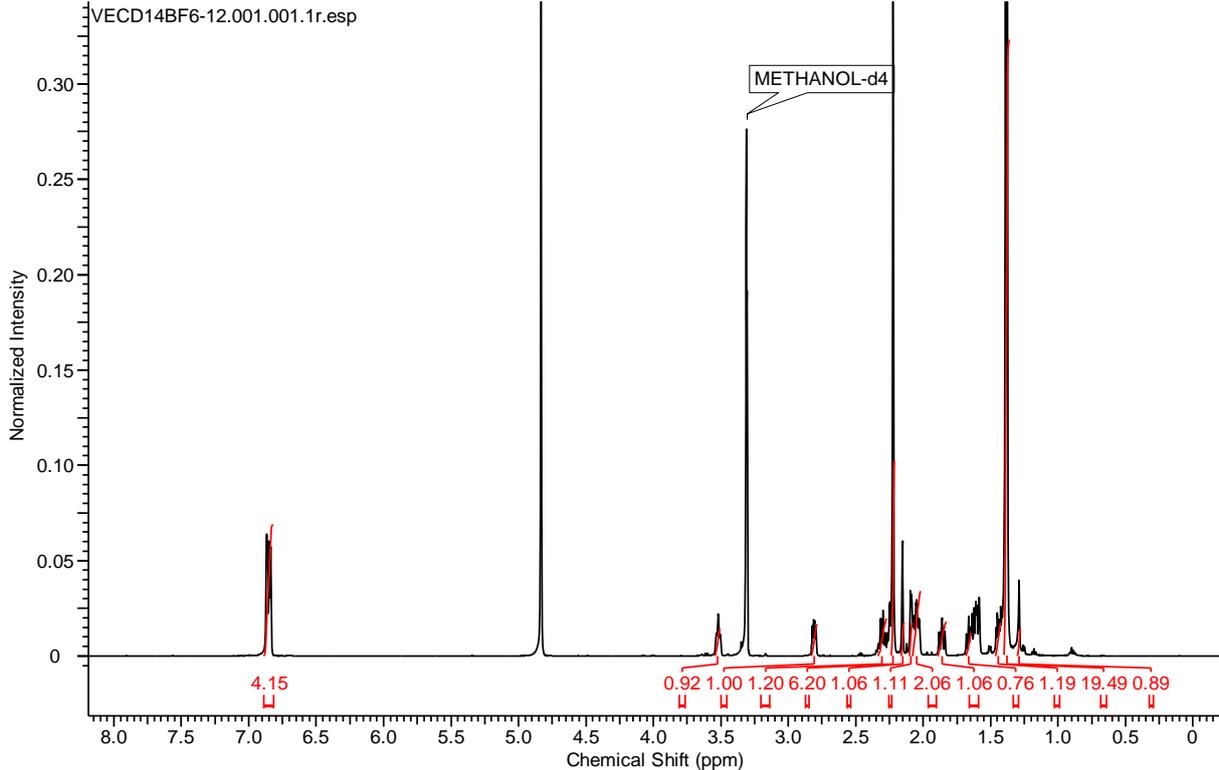
Spectre RMN ^1H de SNB-3 (600MHz, MeOD)



Spectre RMN ^{13}C de SNB-3 (125 MHz, MeOD)

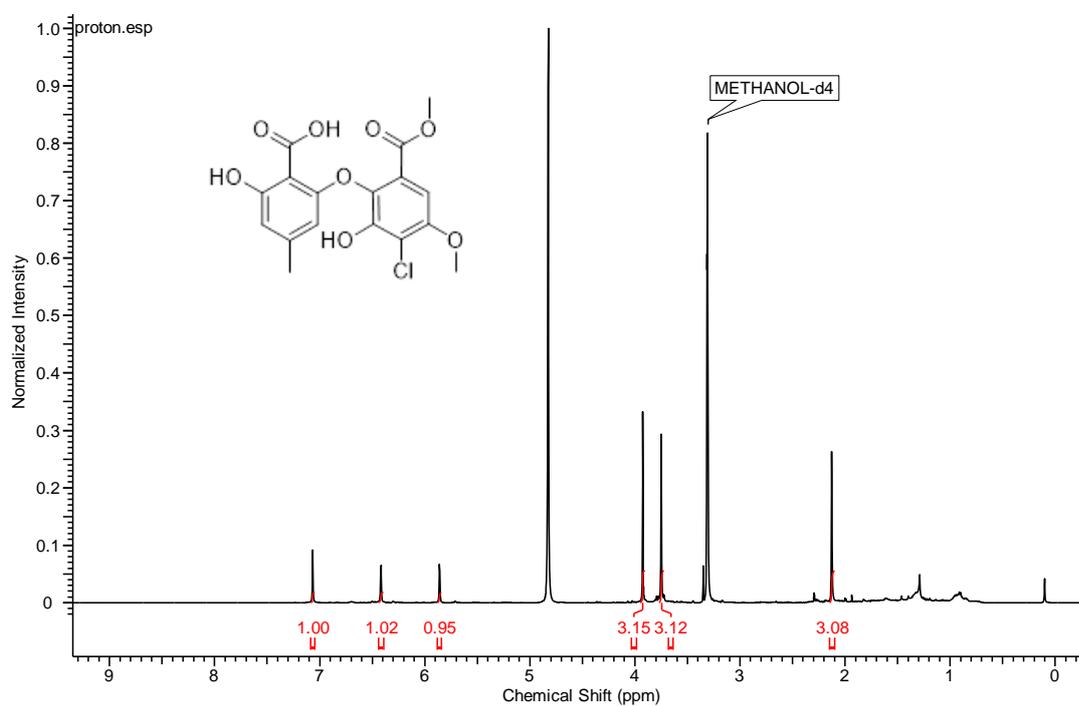


Spectre RMN ¹H de SNB-4 (600MHz, MeOD)

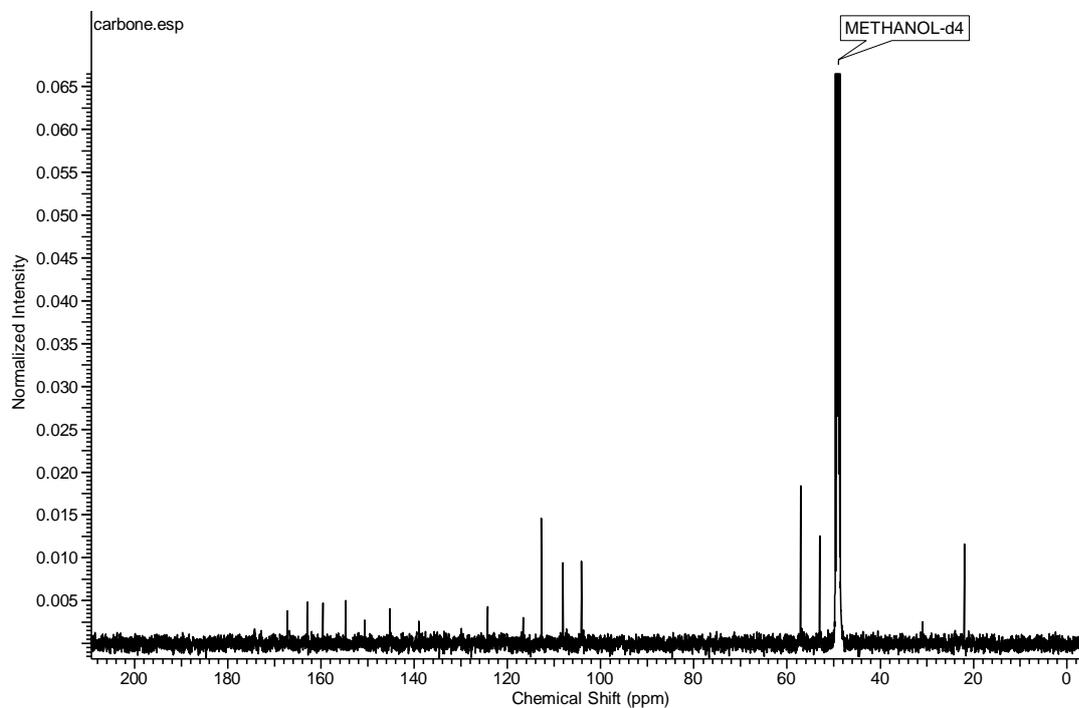


ANNEXES de la partie 6 : *Pestalotiopsis theae* SNB-VECD14E

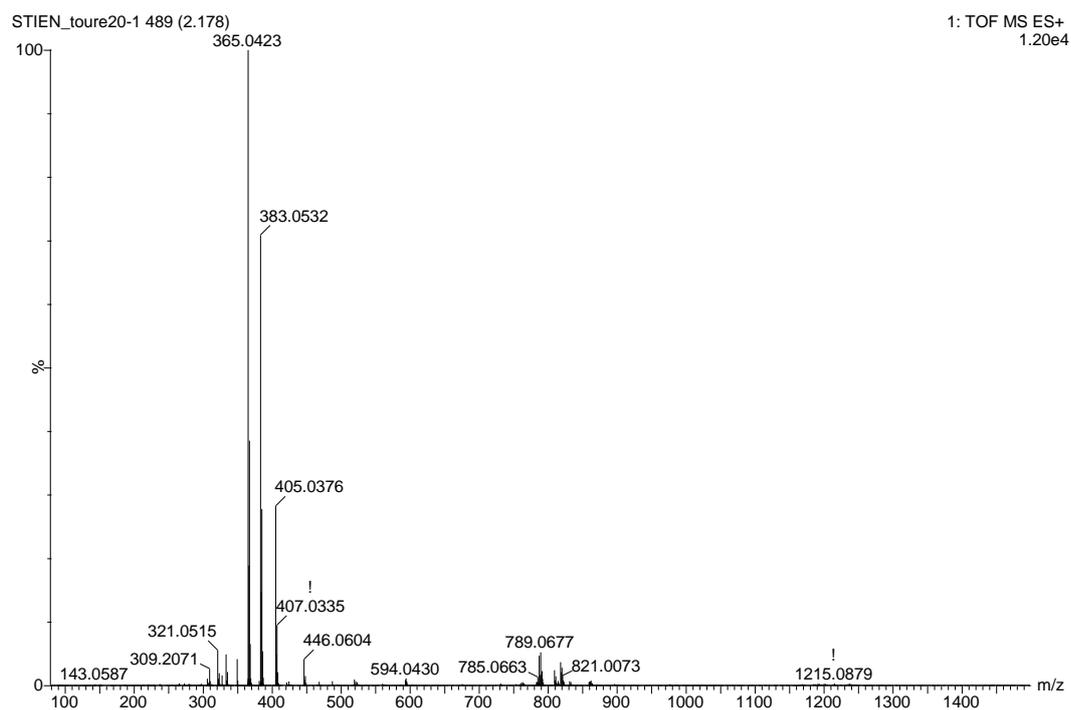
Spectre RMN ^1H de la dihydromaldoxine (500MHz, MeOD)



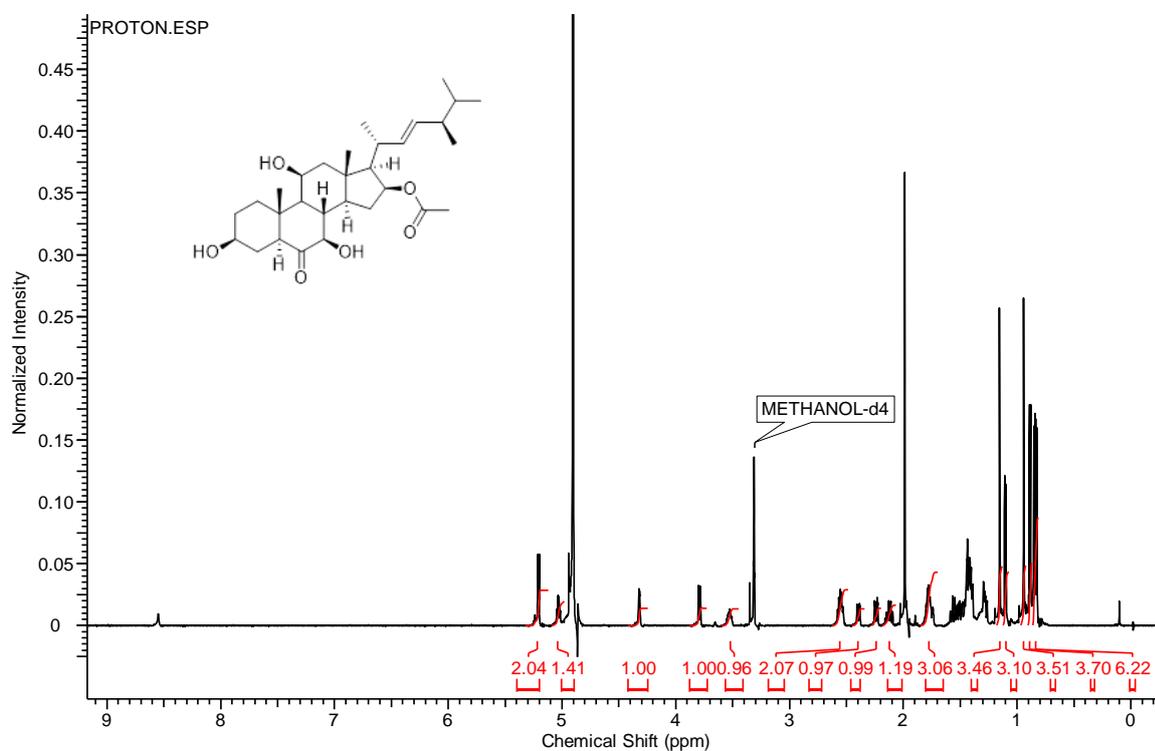
Spectre RMN ^{13}C de la dihydromaldoxine (125 MHz, MeOD)



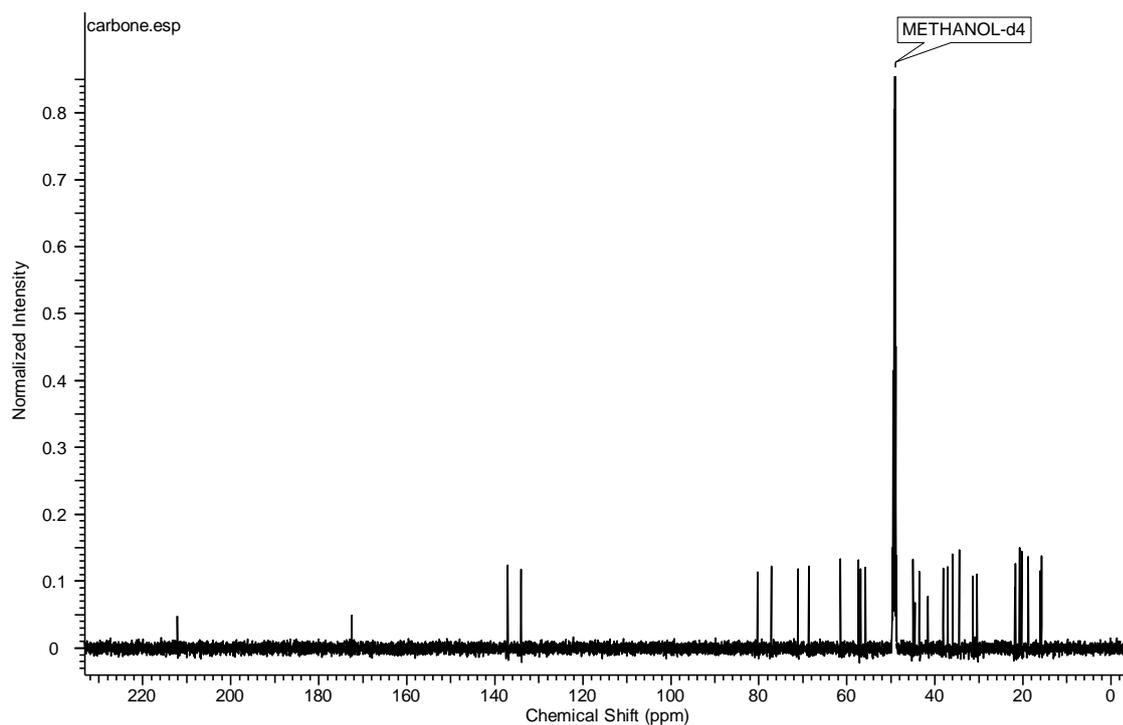
HRMS de la dihydromaldoxine (MeOH)



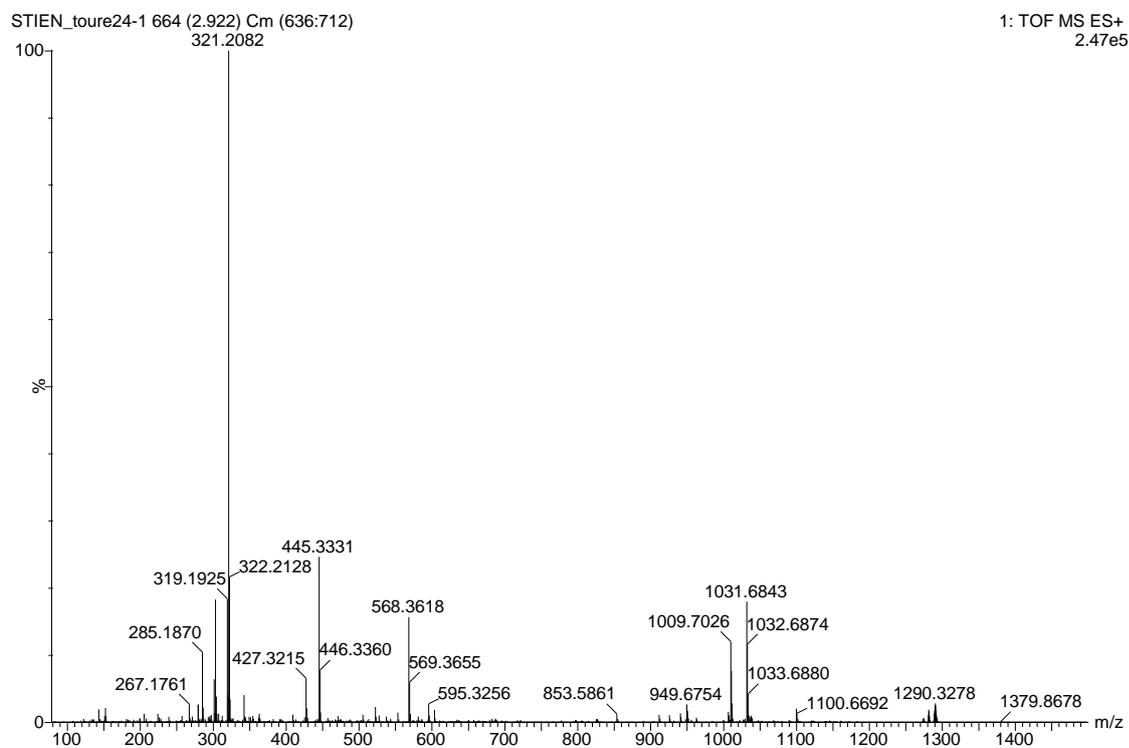
Spectre RMN ¹H de l'anicéquole (600MHz, MeOD)



Spectre RMN ¹³C de l'anicéquole (200MHz, MeOD)



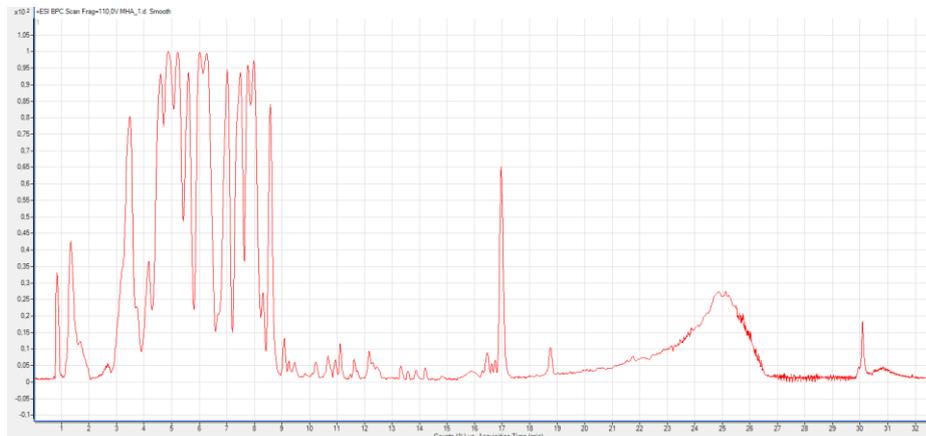
HRMS de l'anicéquole (MeOH)



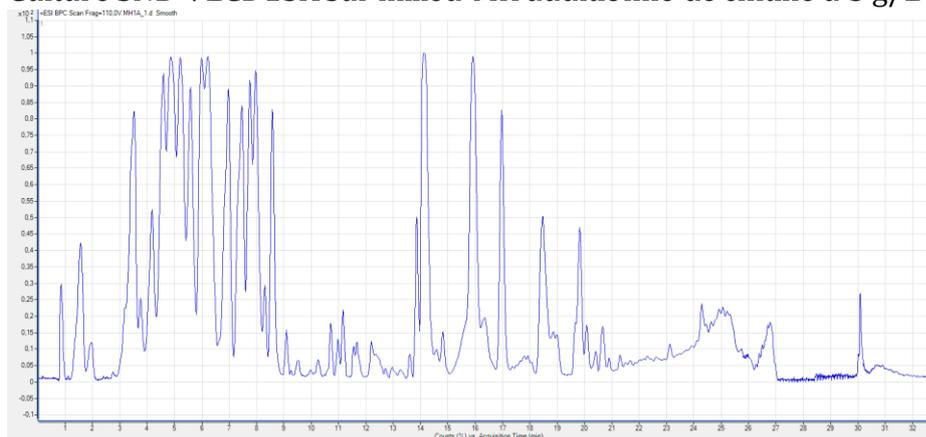
ANNEXES de la partie 7 : *Asaia* sp. SNB-VECD15A

Profils chromatographiques des extraits OSMAC d'*Asaia* sp. SNB-VECD15A

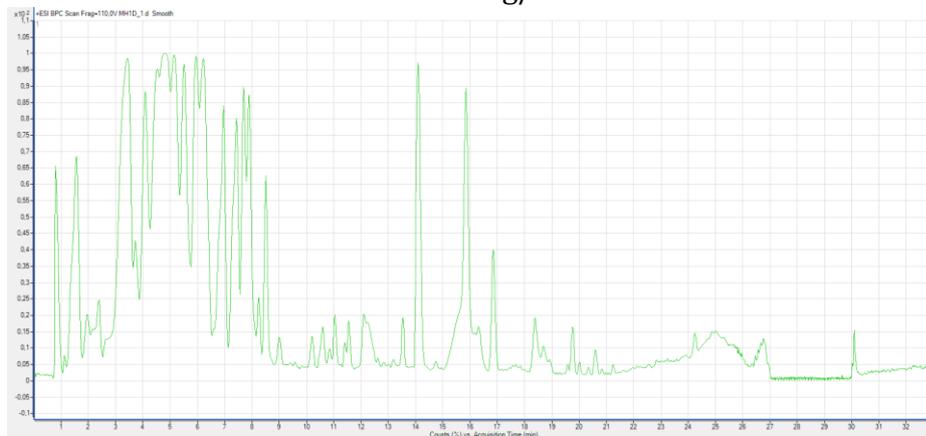
Culture SNB-VECD15A sur milieu MH



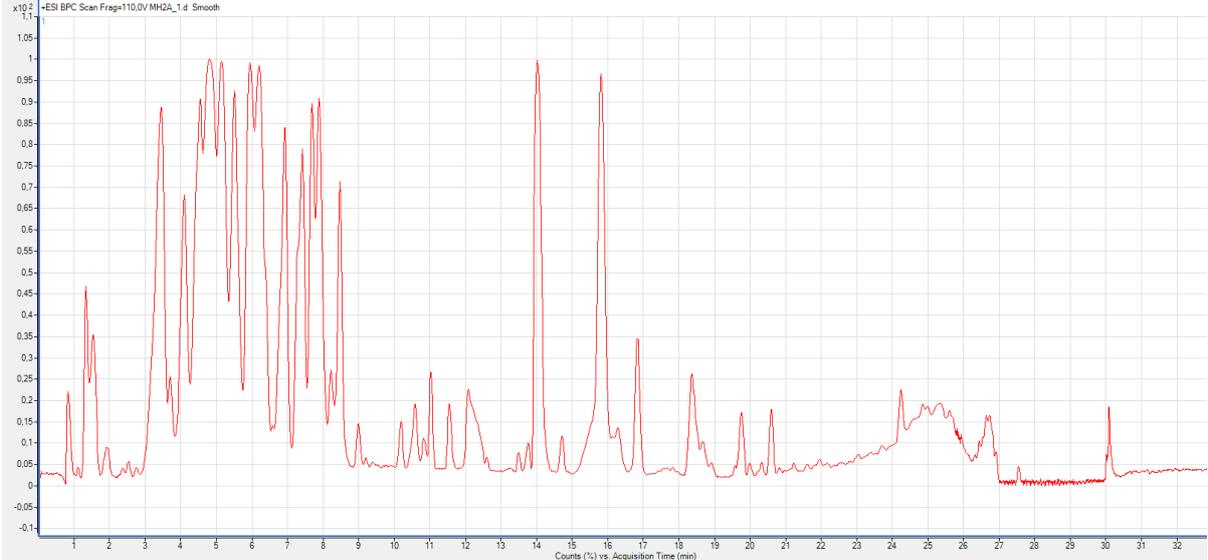
Culture SNB-VECD15A sur milieu MH additionné de chitine à 5 g/L



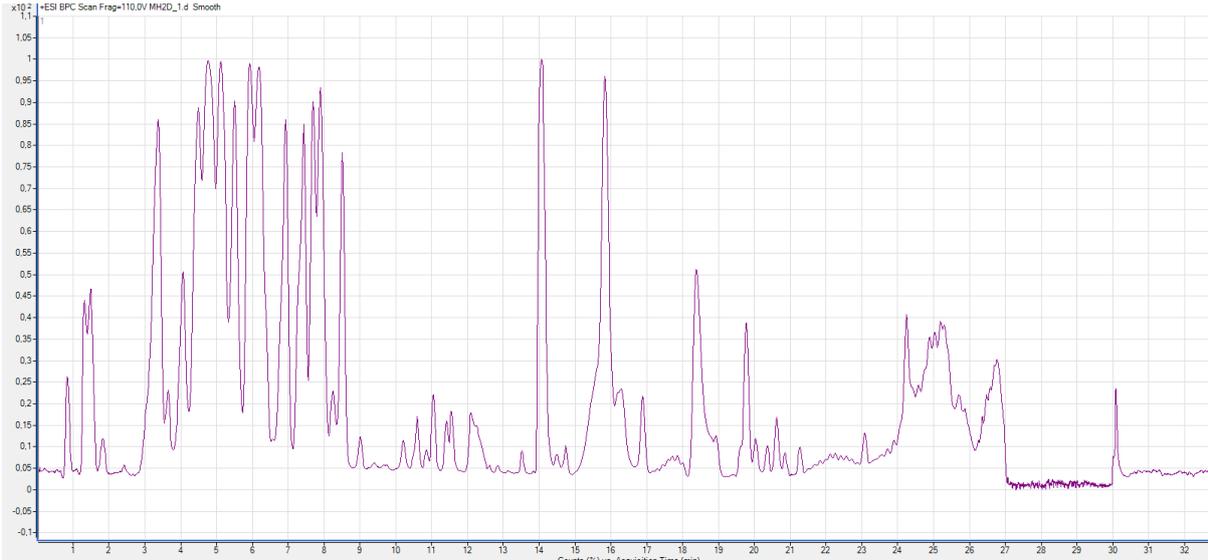
Milieu MH additionné de chitine à 5 g/L



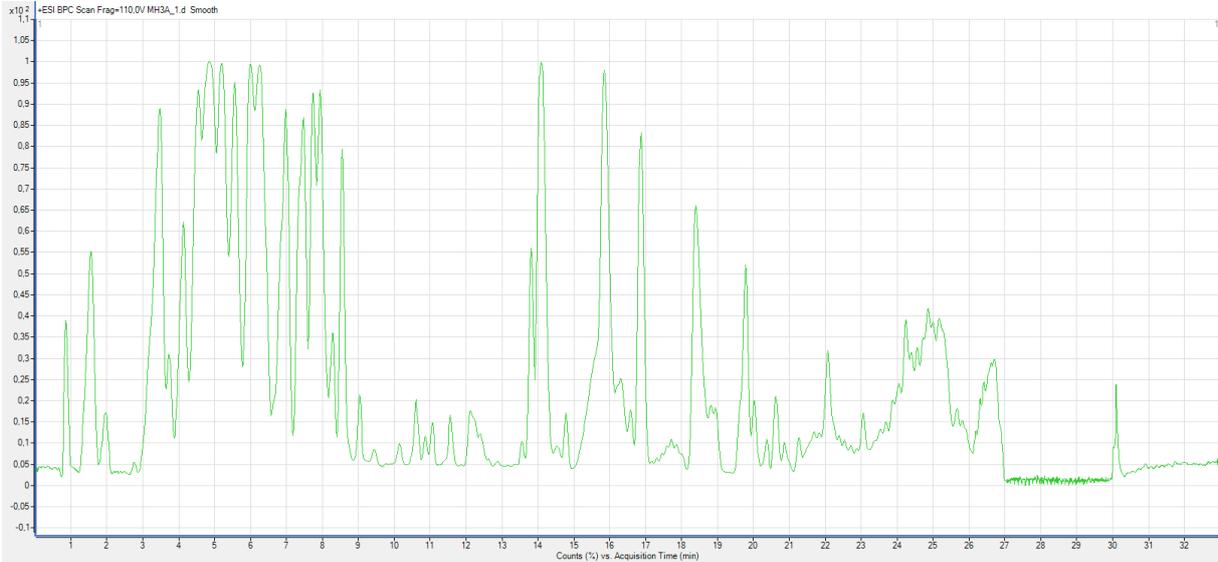
Culture SNB-VECD15A sur milieu MH additionné de de lysat de levure à 5 g/L



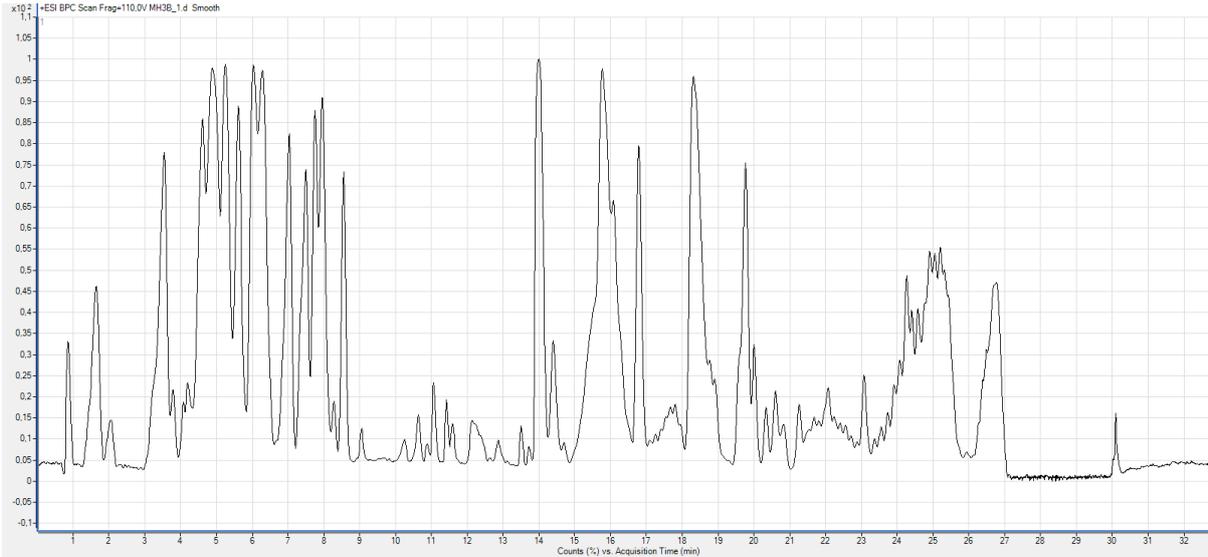
Milieu MH additionné de de lysat de levure à 5 g/L



Culture SNB-VECD15A sur milieu MH additionné de cellules d'insectes lyophilisées à 5 g/L



Milieu MH additionné de cellules d'insectes lyophilisées à 5 g/L



Bibliographie

- ¹ Purvis A, Hector A. Getting the measure of biodiversity. *Nature*. 2000; 405:212-219.
- ² Genilloud O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Nat Prod Rep*. 2017.
- ³ Grabley S., Thiericke R. The impact of natural products on drug discovery. In: Drug Discovery from Nature. S. Grabley, R. Thiericke (eds.), Springer-Berlin, Heidelberg;1999; 3-37
- ⁴ Medema MH, Fischbach MA. Computational approaches to natural product discovery. *Nat Chem Biol*. 2015; 11:639-648.
- ⁵ Bull AT. Clean technology: industry and environment, a viable partnership? *Biologist*. 2000; 47:61-64.
- ⁶ Tulp M, Bohlin L. Functional versus chemical diversity: is biodiversity important for drug discovery? *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23:225-231.
- ⁷ Rikkinen J, Oksanen I, et al. Lichen guilds share related cyanobacterial symbionts. *Science*. 2002; 297:357.
- ⁸ Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep*. 2001; 18:448-459.
- ⁹ Crawford JM, Clardy J. Bacterial symbionts and natural products. *Chem. Commun*. 2011; 47:7559-7566.
- ¹⁰ Brune A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nature*. 2014; 12:168-180.
- ¹¹ Nirma C, Eparvier V, et al. Antifungal agents from *Pseudallescheria boydii* SNB-CN73 isolated from a *Nasutitermes* sp. termite. *J Nat Prod*. 2013; 76:988-991.
- ¹² Sorres J, Nirma C, et al. Tyroscherin and tyroscherin analogs from *Pseudallescheria boydii* SNB-CN85 isolated from termite *Termites cf. hispaniolae*. *Phytochem Lett*. 2017. 22:142-144.
- ¹³ Nirma C, Eparvier V, et al. Antibacterial ilicicolinic acids C and D and ilicicolinal from *Neonectria discophora* SNB-CN63 isolated from a termite nest. *J Nat Prod*. 2015; 78:159-162.
- ¹⁴ Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2013; 37: 699-735.
- ¹⁵ Kellner RL, Dettner K. Differential efficacy of toxic pederin in deterring potential arthropod predators of *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. *Oecologia*. 1996; 107:293-300.
- ¹⁶ Van Arnem EB, Ruzzini AC, et al. Selvamycin, an atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113:12940-12945.
- ¹⁷ Piel J. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; 99:14002-14007.
- ¹⁸ Nakabachi A, Ueoka K, et al. Defensive bacteriome symbiont with a drastically reduced genome. *Curr Biol*. 2013; 23:1478-1484.
- ¹⁹ Arp AP, Hunter WB, et al. Innate immune system capabilities of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Front Physiol*. 2016; 7:417-418.
- ²⁰ Martinson VG, Moy J, et al. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78:2830-2840.
- ²¹ Kaltenpoth M, Gottler W, et al. Symbiotic Bacteria Protect Wasp Larvae from Fungal Infestation. *Curr Biol*. 2005; 15:475-479.
- ²² Kroiss J, Kaltenpoth M, et al. Symbiotic *Streptomyces* provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring. *Nat Chem Biol*. 2010; 6:261-263.
- ²³ Caldera EJ, Poulsen M, et al. Insect symbioses: a case study of past, present, and future fungus-growing ant research. *Env Ent*. 2009; 38:78-92.
- ²⁴ Currie CR. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia*. 2001; 128:99-106.
- ²⁵ Currie CR. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annu Rev Micro*. 2001; 55:357-380.
- ²⁶ Currie CR, Poulsen M, et al. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science*. 2006; 311: 81-83.
- ²⁷ Currie C, Mueller UG, et al. The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:7998-8002.
- ²⁸ Currie CR, Scott JA, et al. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*. 1999; 398: 701-704.
- ²⁹ Oh DC, Poulsen M, et al. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. *Nat Chem Biol*. 2009; 5:391-393.
- ³⁰ Barke J, Seipke RF, et al. A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biol*. 2010; 8:109.
- ³¹ Seipke RF, Barke J, et al. A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS One*. 2011; 6:e22028.
- ³² Anand AAP, Vennison SJ, et al. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *J Insect Sci*. 2010; 10:107.
- ³³ Wong LJ, H'ng PS, et al. Termite digestome as a potential source of symbiotic microbiota for lignocelluloses degradation: a review. *Pak J Bio Sci*. 2014; 17:956-963.

- ³⁴ Breznak JA, Brune A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu Rev Entomol*. 1994; 39:453-487.
- ³⁵ Tokuda G, Watanabe H. Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. *Biol Lett*. 2007; 3:336-339.
- ³⁶ Hongoh Y. Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010; 74:1145-1151.
- ³⁷ Warnecke F, Luginbühl P, et al. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature*. 2007; 450:560-565.
- ³⁸ Breznak JA, Brill WJ, et al. Nitrogen fixation in termites. *Nature*. 1973; 244:577-580.
- ³⁹ Inward DJG, Vogler AP, et al. A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. *Mol Phylogenet Evol*. 2007; 44:953-967.
- ⁴⁰ Mueller UG, Gerardo NM, et al. The evolution of Agriculture in Insects. *Ann Rev Ecology, Evol, System*. 2005; 36:563-595.
- ⁴¹ Vega FE, Meyling NV, et al. Fungal entomopathogens. In: *Insect Pathology*. Ed. Fernando E. Vega and Harry K. Kaya. 2012. p171-220
- ⁴² Augustyniuk-Kram A, Kram KJ. Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (Review). In: *Forest Ecosystems – More than Just Trees*. Ed. Juan A. Blanco. 2012. p265-294.
- ⁴³ Fuxa JR, Tanada Y. Epizootiology of insect diseases. *Wiley-Interscience*. 1987. 576p.
- ⁴⁴ Gibson DM, Donzelli DGG, et al. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. *Nat Prod Rep*. 2014; 31:1287-1305.
- ⁴⁵ Pedras MS, Zaharia LL, et al. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*. 2002; 59:579-596.
- ⁴⁶ Beemelmanns C, Guo H, et al. Natural products from microbes associated with insects. *Beilstein J Org Chem*. 2016; 12:314-327.
- ⁴⁷ Aldridge DC, Turner WB. Structures of cytochalasin C and cytochalasin D from *Metarhizium anisopliae*. *J Chem Soc*. 1969; 6:923-928.
- ⁴⁸ Kondo S, Meguriya N, et al. K-582, a new peptide antibiotic. *Int J Antibiot*. 1980; 33:533-542.
- ⁴⁹ Patrick M, Adlard MW. Production of an indolizidine alkaloid, swainsonine by the filamentous fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol Lett*. 1993; 15:997-1000.
- ⁵⁰ Ngoka LCM, Gross ML, et al. Sodium-directed selective cleavage of lactones: a method for structure determination of cyclodepsipeptides. *Int J Mass Spectrom*. 1999; 182/183:289-298.
- ⁵¹ Vining LC, Kelleher WJ, et al. Oosporein production by a strain of *Beauveria bassiana* originally identified as *Amanita muscaria*. *J Microbiol*. 1962; 8:931-933.
- ⁵² Brewer D, Jen WC, et al. The antibacterial activity of some naturally occurring 2,5-dihydroxy-1,4-benzochinones. *Can J Microbiol*. 1984; 30:1068-1072.
- ⁵³ Terry BJ, Liu WC, et al. Inhibition of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase by the natural product oosporein. *J Antibiot*. 1992; 45:286-288.
- ⁵⁴ Nagaoka T, Nakata K, et al. Antifungal activity of oosporein from antagonistic fungus against *Phytophthora infestans* Z. *Naturforsch*. 2004; 59:302-304.
- ⁵⁵ Amin GA, Youssef NA, et al. Assessment of insecticidal activity of red pigment produced by the fungus *Beauveria bassiana*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010; 26:2263-2268.
- ⁵⁶ Feng P, Shang Y, et al. Fungal biosynthesis of the hibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2015; 112:11365-11370.
- ⁵⁷ Suzuki A, Kanaoka M, et al. Bassionalide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Tet Lett*. 1977; 25:2167-2170.
- ⁵⁸ Jegorov A, Sedmera P, et al. Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosaroseus*. *Phytochemistry*. 1994; 37:1301-1303.
- ⁵⁹ Logrieco A, Moretti A, et al. Beauvericin production by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64:3084-3088.
- ⁶⁰ Luangsa-ard JJ, Berkaew P, et al. A beauvericin hot spot in the genus *Isaria*. *Mycol Res*. 2009; 13:1389-1395.
- ⁶¹ Vallet-Gely I, Lemaitre B, et al. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nat Rev*. 2008; 6:302-313.
- ⁶² Lecadet MM, Frachon E, et al. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol*. 1999; 86:660-672.
- ⁶³ Argôlo-Filho RC, Loguercio LL. *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. *Insects*. 2014; 5:62-91.
- ⁶⁴ Schnepf E, Crickmore N, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62:775-806.
- ⁶⁵ Xu C, Wang BC, et al. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins (Basel)*. 2014; 6:2732-2770.
- ⁶⁶ Bravo A, Gill SS, et al. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 2007; 49:423-435.
- ⁶⁷ Butko P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69:2415-2422.
- ⁶⁸ Klassen JL. Microbial secondary metabolites and their impacts on insect symbioses. *Curr Opin Insect Sci*. 2014; 4:15-22.

-
- ⁶⁹ Challinor VL, Bode HB. Bioactive natural products from novel microbial sources. *Ann NY Acad Sci.* 2015; 1354:82-97.
- ⁷⁰ Contreras MS, Vlisidou I. The Diversity of Insect-bacteria Interactions and its Applications for Disease Control.
- ⁷¹ Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Prod Rep.* 2009; 26:338-362.
- ⁷² Goodrich-Blair H, Clarke DJ. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Mol Microbiol* 2007; 64:260-268.
- ⁷³ Duchaud E, Rusniok C, et al. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nat Biotechnol.* 2003; 21:1307-1313.
- ⁷⁴ Vodovar N, Vallenet D, et al. Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat Biotechnol.* 2006; 24:673-679.
- ⁷⁵ Vodovar N, Vinals M, et al. *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102:11414-11419.
- ⁷⁶ Dieppl G, Opota O, et al. 2015. *Pseudomonas entomophila*: a versatile bacterium with entomopathogenic properties. In: Ramos JL, Goldberg J, Filloux A. Ed. *Pseudomonas*. Springer, Dordrecht
- ⁷⁷ Chaston JM, Suen Garret, et al. The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: convergent lifestyles from divergent genomes. *PLoS One.* 2011; 6:e27909.
- ⁷⁸ Dutschky SR. Insect Microbiology. *Adv App Microbiol.* 1959; 1:175-200.
- ⁷⁹ Poinar Jr. GO, et al. isolation of detective bacteriophages from *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *IRCS Med Sci.* 1980; 8:141.
- ⁸⁰ Joyce SA, Brachmann AO, et al. Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008; 47:1942-1945.
- ⁸¹ Li J, et al. Identification of two pigments and a hydroxystilbene antibiotic from *Photorhabdus luminescens*. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61:4329-4333.
- ⁸² Joyce SA, Brachmann AO, et al. Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. *Angew Chem Int Ed.* 2008; 47:1942-1945.
- ⁸³ Eleftherianos I, Boundy S, et al. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104:2419-2424.
- ⁸⁴ OMS. Résistance aux antimicrobiens. http://www.who.int/drugresistance/Microbes_and_Antimicrobials/fr/ (Accessed July 2017).
- ⁸⁵ Da Silva LCN, Da Silva MV, et al. Editorial: New Frontiers in the Search of Antimicrobials Agents from Natural Products. *Front Microbiol.* 2017; 8:210.
- ⁸⁶ Wright GD. Something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Can J Microbiol.* 2014; 60:147-154.
- ⁸⁷ Aminov RI. A brief history of antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front in Microbiol.* 2010; 1:1-7.
- ⁸⁸ Centers for Disease Control and Prevention. Office of Infectious Disease. Antibiotic resistance threats in the United States. April 2013. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013> (Accessed July, 2017).
- ⁸⁹ Fair JR, Tor Y. Antibiotics and Bacterial resistance in the 21st Century. *Perspec Med Chem.* 2014; 6:25-64.
- ⁹⁰ Cohen M. Changing patterns of infectious disease. *Nature.* 2000; 406:762-767.
- ⁹¹ Commission européenne. Communiqué de presse. Santé humaine et animale: La Commission poursuit la lutte contre la résistance aux antimicrobiens avec l'annonce d'un deuxième plan d'action. http://europa.eu/rapid/press-release_IP-17-205_fr.htm?locale=FR (Accessed October 2017).
- ⁹² Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. US Department of Health and Human Services. <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html> (Accessed October 2017).
- ⁹³ Ullah H, Ali S. Classification of anti-bacterial agents and their functions. In: *Antibacterial agents*. Ed. Dr. Ranjith Kumavath. 2017:1-16.
- ⁹⁴ Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Disc.* 2013; 12:371-387.
- ⁹⁵ Benveniste R, Davies J. Structure-activity relationships among the aminoglycoside antibiotics: role of hydroxyl and amino groups. *Antimic Agents Chemother.* 1973; 4:402-409.
- ⁹⁶ Kohanski MA, Dwyer DJ, et al. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8:423-35.
- ⁹⁷ Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001; 65: 232-260.
- ⁹⁸ Vandeputte P, Ferrari S, et al. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol.* 2011; 1-26.
- ⁹⁹ Polak A, Scholer HJ. Mode of action of 5-fluorocytosine. *Revue de l'Institut Pasteur de Lyon.* 1980; 13:233-244.
- ¹⁰⁰ Benson JM, Nahata MC. Clinical use of systemic antifungal agents. *Clin Pharm.* 1988; 7:424-438.
- ¹⁰¹ Vermes A, Guchelaar HJ, et al. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46:171-179.
- ¹⁰² Duschinsky B, Plevin E, et al. The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J Am Chem Soc.* 1957; 79:4559-4560.
- ¹⁰³ Grunberg E, Titsworth E, et al. Chemotherapeutic activity of 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother.* 1963; 3:566-568.
-

- ¹⁰⁴ Tassel D, Madoff MA. Treatment of *Candida* sepsis and *Cryptococcus meningitis* with 5-fluorocytosine. A new antifungal agent *JAMA*. 1968; 206:830-832.
- ¹⁰⁵ Daneshmend TK, Warnock DW. Clinical pharmacokinetics of systemic antifungal drugs. *Clin Pharmacokinet*. 1983; 8:17-42.
- ¹⁰⁶ Dannaoui E. Résistance des *Candida* aux antifongiques : détection et mécanismes. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2013; 450:71-77.
- ¹⁰⁷ Vandeputte P. Thèse. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Interactions ente organismes. Université d'Angers, 2008.
- ¹⁰⁸ Dutcher JD, Gold W, et al. Amphotericin B, its production and its salts, US patent 2 908 611. 1959.
- ¹⁰⁹ Lemke A, Kiderlen AF, et al. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005; 68:151-162.
- ¹¹⁰ Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10:1-10.
- ¹¹¹ Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter*. 2006; 19:130-139.
- ¹¹² Sanglard D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002; 20:462-469.
- ¹¹³ Denning DW. Echinocandins: a new class of antifungal. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 49:889-891.
- ¹¹⁴ Franzot SP, Casadevall A. Pneumocandin L-743,872 enhances the activities of amphotericin B and fluconazole against *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41:331-336.
- ¹¹⁵ Espinel-Ingroff A. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J Clin Microbiol*. 1998; 36:2950-2956.
- ¹¹⁶ Oakley KL, Moore CB, et al. In vitro activity of the echinocandin antifungal agent LY303,366 in comparison with itraconazole and amphotericin B against *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42:2726-2730.
- ¹¹⁷ Nwabor FO. Larvicidal activity and toxicity of medicinal plant extracts on *Anopheles gambiae*. University of Nigeria, Nsukka. Department of Microbiology. 2012. http://www.academia.edu/4152651/Historical_development_of_insecticides. (Accessed August 2017).
- ¹¹⁸ Taylor EL, Holley AG, et al. Pesticide development a brief look at the history. *South Reg Ext Forest*. 2007.
- ¹¹⁹ Regnault-Roger C, Philogène B, et al. Biopesticides d'origine végétale. Ed. Tec & Doc. 2002. 337p.
- ¹²⁰ Banaszkiwicz T. Evolution of Pesticide Use. In: Contemporary Problems of Management and Environmental Protection. Ed. Prof. Dr hab, Krystyna A. Skibniewska. 2010. Vol 5, Chap 1: 7-18.
- ¹²¹ IRAC. Insecticide Resistance Action Committee. Modes of action. <http://www.irac-online.org/modes-of-action/> (Accessed August 2017).
- ¹²² Coats JR. Mechanisms of toxic action and structure activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Env Health Persp*. 1990; 87:255-262.
- ¹²³ Holan G. New halocyclopropane insecticides and the mode of action of DDT. *Nature*. 1969; 221:1025-1029.
- ¹²⁴ Narahashi T. Nerve membrane as a target for pyrethroids. *Pestic Sci*. 1976; 7:267-272.
- ¹²⁵ Coats JR. Structure-activity relationships in DDT analogs. In: Insecticide Mode of Action (J. R. Coats, Ed.), Academic Press, New York, 1988; 29-43.
- ¹²⁶ Bloomquist JR, Soderlund DM. Neurotoxic insecticides inhibit GABA-dependent chloride uptake by mouse brain vesicles. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985; 133:37-43.
- ¹²⁷ Sanchez-Bayo F. Insecticides Mode of Action in Relation to Their Toxicity to Non-Target Organisms. *J Environm Analytic Toxicol*. 2011; 5:4
- ¹²⁸ Journal Officiel de la République Française (JORF). No. 204 du 4 septembre 2007 page 14592 texte n° 143. <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000823784&fastPos=1&fastReqId=353325766&categorieLien=id&oldAction=rechTexte>
- ¹²⁹ Fukuto TR. Mechanisms of action of organophosphate and carbamate insecticides. *Env Health Persp*. 1990; 87:245-254.
- ¹³⁰ Kadala PA. Thèse. Action des pyrèthrinoides sur le canal sodique activé par le potentiel des neurones du système olfactif de l'abeille domestique *Apis mellifera*. L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. 2011.
- ¹³¹ Soderlund DM. Molecular Mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Arch Toxicol*. 2012; 86:165-181.
- ¹³² OMS. Guide pour le traitement et l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide. 2002. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67574/1/WHO_CDS_RBM_2002.41_fre.pdf (Accessed September 2017)
- ¹³³ OMS. Paludisme. Méthode de lutte antivectorielle de base. http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/core_methods/fr/ (Accessed August 2017).
- ¹³⁴ Jeschke JA, Blissard GW, et al. On the classification and nomenclature of baculovirus: A proposal for revision. *Arch Virol*. 2011; 151:1257-1266.
- ¹³⁵ Réseaux de Réflexion et de Recherches sur les Résistances aux pesticides. https://www.google.fr/url?sa=t&rcct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwIZ5qCBqZj7WAhXB0RQKHYNfBhoQFggsMAE&url=https%3A%2F%2Fcolloque.inra.fr%2Fresistances-pesticides%2FMedia%2FFichier%2Fdiaporamas%2F11-MOA-insecticides-MSp&usq=AFQjCNFk4nhlxOujm_udNtCvGV1QFkOAiQ (Accessed August 2017).
- ¹³⁶ Yamamoto I. Nicotine to nicotinoids. 1962 to 1997. In: Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor. Ed. Yamamoto I, Casida JE. Springer-Verlag, Tokyo, Japan, 1999; 3-27.

- ¹³⁷ Oberemok VV, Laikova KV, et al. A short history of insecticides. *J Plant Prot Res*. 2015; 55.
- ¹³⁸ Goulson D. Neonicotinoids impact bumblebee colony fitness in the field: a reanalysis of the UK's Food & Environment Research Agency 2012 experiment. *Peer J*. 2015.
- ¹³⁹ Woodcock BA, Isaac NJB, et al. Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England. *Nature Comm*. 2016; 7:12459.
- ¹⁴⁰ Journal Officielle de l'Union Européenne. Règlement d'exécution (UE) No 485/2013 de la commission du 24 mai 2013. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:139:0012:0026:FR:PDF> (Accessed August 2017).
- ¹⁴¹ Post LC, Vincent WR. A new insecticide inhibits chitin synthesis. *Naturwissenschaften*. 1973; 60:431-432.
- ¹⁴² Matsumura F. Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: A review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects. *Pest Biochem Physiol*. 2009; 97:133-139.
- ¹⁴³ Chandler D, Bailey AS, et al. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Phil Trans R Soc B*. 2011; 366:1987-1998.
- ¹⁴⁴ ANSES. Dossier. Les résistances aux insecticides, antiparasitaires, antibiotiques... Comprendre ou en est la recherche? <https://www.anses.fr/fr/system/files/CDLR-mg-Antibioresistance3.pdf> (Accessed September 2017).
- ¹⁴⁵ Schmutterer H. Properties and potential of natural pesticides from neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu Rev Entomol*. 1990; 35:271-297.
- ¹⁴⁶ Dunkel FV, Weaver DK, et al. Growth regulatory effects of Rwanda medicinal plant, *Tetradenia riparia* (Hochst) (Lamiaceae) on stored grain and bean insects. In: Fleurat-Lessard F & Ducom P. Proceedings 5th International Working Conference on Stored - Products Protection (vol. III). Bordeaux, France. 1990; 1609-1618.
- ¹⁴⁷ Neem: A Tree for Solving Global Problems. National Academy Press, Washington DC, 1992; 39-50
- ¹⁴⁸ Srivastava M, Raizada R. Lack of toxic effect of technical azadirachtin during postnatal development of rats. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45:465-471.
- ¹⁴⁹ Maheswaran R, Ignacimuthu S. A novel biopesticide PONNEEM to control human vector mosquitoes *Anopheles stephensi* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Environ Sci Pollut Res*. 2015; 22:13153-13166.
- ¹⁵⁰ Brijesh S, Daswani PG, et al. Studies on *Dalbergia sissoo* (Roxb.) leaves: possible mechanism(s) of action in infectious diarrhoea. *Indian J Pharmacol*. 2006; 38:120-124.
- ¹⁵¹ Murugan K, Murugan P, et al. Larvicidal and repellent potential of *Albizia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta:Diptera:Culicidae). *Bioresour Technol*. 2006; 98:198-201.
- ¹⁵² Kamaraj C, Abdul Rahman A, et al. Larvicidal efficacy of medicinal plant extracts against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). *Trop Biomed*. 2010; 27:211-219.
- ¹⁵³ Kannathasan K, Senthilkumar A, et al. Larvicidal activity of fatty acid methyl esters of *Vitex* species against *Culex quinquefasciatus*. *Parasitol Res*. 2008; 103:999-1001.
- ¹⁵⁴ Deravel J, Krier F, et al. Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotech Agral Soc Env*. 2014; 18:220-232.
- ¹⁵⁵ Kumar S, Chandra A, et al. *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. *J Env Biol*. 2008; 29:641-653.
- ¹⁵⁶ Thakore, Y. The biopesticide market for global agricultural use. *Ind Biotechnol*. 2006 ;2:194-208
- ¹⁵⁷ Usta C. Microorganisms in biological pest control - A review (Bacterial toxin application and effect of environmental factors), In: Current Progress in Biological Research. Ed. Dr. Marina Silva-Opps. 2013.
- ¹⁵⁸ AbdelGhany TM. Entomopathogenic Fungi and Their Role In Biological Control. Ed. Tarek Mohamed Abd El-Ghany. 2015.
- ¹⁵⁹ Ferron P. Modification of the development of *Beauveria tenella* mycosis in *Melolontha melolontha* larvae by means of reduced doses of organophosphorus insecticides. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1971; 14:457-466.
- ¹⁶⁰ Carlberg G. *Bacillus thuringiensis* and microbial control of flies. *MIRCEN J Applied Microniol Biotech*. 1986; 2:267-274.
- ¹⁶¹ Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*. 2008; 16:115-125.
- ¹⁶² Washburn J, Trudeau D, et al. Early pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens*: a comparison of the 'M' and 'S' strategies for establishing fatal infection. *J Gen Virol*. 2003; 84:343-351.
- ¹⁶³ Mindlin SZ, Soina VS, et al. Isolation of antibiotic resistance bacterial strains from East Siberia permafrost sediments. *Genetika*. 2008; 44:36-44.
- ¹⁶⁴ Official Journal of the European Union. Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of The Council of 22 September 2003 on Additives for use in Animal Nutrition. Available at: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:EN:PDF>.
- ¹⁶⁵ Nussbaum FV, Brands M, et al. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry.—Exodus or Revival? *Angew Chem Int*. 2006; 45:5072-5129.
- ¹⁶⁶ Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science*. 2009; 325:1089-1093.
- ¹⁶⁷ Boucher HW, Talbot GH, et al. An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009; 48:1-2.

- ¹⁴⁸ European centre for disease prevention and control. Communication from the commission to the european parliament and the council. Action plan against the rising threats from Antimicrobial Resistance. Available at: http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/docs/communication_amr_2011_748_en.pdf. Accessed July 2017.
- ¹⁴⁹ European Medicine Agency. The bacterial challenge: time to react. A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. Accessed July 2017.
- ¹⁵⁰ Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant Bugs in the 21st Century--A Clinical Super-challenge. *N Engl J Med*. 2009; 360:439-443.
- ¹⁵¹ Kaper JB, Nataro JP, et al. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2:123-140.
- ¹⁵² Livermore DM, Hope R, et al. Non-susceptibility trends among Enterobacteriaceae from Bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62(Suppl 2):41-54.
- ¹⁵³ Pfeifer Y, Witte W, Holfelder M, et al. NDM-1 Producing *Escherichia coli* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55:1318-1319.
- ¹⁵⁴ Nordmann P, Poirel L, et al. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66:689-692.
- ¹⁵⁵ Guillot J, Dannaoui. La résistance aux antifongiques : importance en médecine humaine et vétérinaire. *Bull. Acad Vét France*. 2005; 168: 314-319.
- ¹⁵⁶ Sanguinetti M, Posteraro B, et al. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*. 2015; 58:2-13.
- ¹⁵⁷ Tenson T, Lovmar M, et al. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol*. 2003; 330:1005-1014.
- ¹⁵⁸ Gahan JB, Lindquist AW. DDT residual sprays applied in buildings to control *Anopheles quadrimaculatus*. *J Eco Ent*. 1945; 38:223-230.
- ¹⁵⁹ Roberts DR, Chareonviriyaphap T, et al. Methods of testing and analyzing excito-repellency responses of malaria vectors to insecticides. *J Am Mosq Cont Assoc*. 1997; 13:13-17.
- ¹⁶⁰ Chareonviriyaphap T, Roberts DR, et al. Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus*, a malaria vector in the Americas. *J Am Mosq Cont Assoc*. 1997; 13:171-183.
- ¹⁶¹ Wood O, Hanrahan S, et al. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasit Vectors*. 2010; 3:67.
- ¹⁶² Ahmad M, Denholm I, et al. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Manag Sci*. 2006; 62:805-810.
- ¹⁶³ IRAC. Insecticide Resistance Action Committee. Résistance mechanisms. <http://www.irac-online.org/about/resistance/mechanisms/> (Accessed August 2017).
- ¹⁶⁴ Despres L, David JP, et al. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol Evol*. 2007; 22:298-307.
- ¹⁶⁵ french-Constant RH, Daborn PJ, et al. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet*. 2004; 20:163-170.
- ¹⁶⁶ Spellberg B, Powers JH, et al. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin Infect Dis*. 2004; 38:1279-1286.
- ¹⁶⁷ Bartlett JG, Gilbert DN, et al. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin Infect Dis*. 2013; 56:1445-1450.
- ¹⁶⁸ Piddock IJ. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? *Lancet Infect Dis*. 2012; 12:249-253.
- ¹⁶⁹ Gould IM, Bal AM. New antibiotic agents in the pipeline and how they can overcome microbial resistance. *Virulence*. 2013; 4:185-191.
- ¹⁷⁰ Viswanathan VK. Off-label abuse of antibiotics by bacteria. *Gut Microbes*. 2014; 5:3-4.
- ¹⁷¹ OMS. Projet d'action mondiale pour lutter contre les vecteurs 2017-2030. http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030-fre.pdf (Accessed August 2017).
- ¹⁷² OMS. Résistance aux insecticides. http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/insecticide_resistance/fr/ (Accessed August 2017).
- ¹⁷³ Coz J. Utilisation de la génétique dans le contrôle des espèces d'insectes vecteurs de maladies humaines. In: *Medicine Tropicale*. 1978; 38:659-665.
- ¹⁷⁴ Perry T, Batterham P, et al. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochem Mol Bio*. 2011; 41:411-422.
- ¹⁷⁵ Zhang W, Jiang F, et al. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proc Int Acad Ecol Environ Sci*. 2011; 1:125-144.
- ¹⁷⁶ Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation. Le plan Ecophyto 2018. <http://agriculture.gouv.fr/ecophyto> (Accessed August 2017).
- ¹⁷⁷ Ozen AI, Ussery DW. Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*? *Microb Ecol*. 2012; 63:239-248.
- ¹⁷⁸ Figueiredo S. Thèse. *Acinetobacter* spp. et réservoir de gènes de carbapénémases. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français.
- ¹⁷⁹ Erlacher A, Cernava T, et al. Rhizobiales as functional and endosymbiotic members in the lichen symbiosis of *Lobaria pulmonaria* L. *Front Microbiol*. 2015; 6:53.
- ¹⁸⁰ OMS. Lutte contre la dengue. <http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/fr/> (Accessed August 2017).
- ¹⁸¹ Bhatt S, Gething PW, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496:504-507.

- 234 Brady SF, Wright SA, et al. Pantocin B, an antibiotic from *Erwinia herbicola* discovered by heterologous expression of cloned genes. *J Am Chem Soc.* 1999; 121:11912–11913.
- 235 Wright SA, Zumoff CH, et al. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67:284–292.
- 236 Fredenhagen A, Tamura SY, et al. Andrimid, a new peptide antibiotic produced by an intracellular bacterial symbiont isolated from a brown planthopper. *J Am Chem Soc.* 1987; 109:4409–4411.
- 237 Escalante G, Campos V, et al. Arsenic resistant bacteria isolated from arsenic contaminated river in the Atacama Desert (Chile). *Bull Environ Contam Toxicol.* 2009; 83:657–661.
- 238 Ozdemir G, Ceyhan N, et al. Biosorption of chromium(VI), cadmium(II) and copper(II) by *Pantoea* sp TEM18. *Chem. Eng J.* 2004; 102:249–253.
- 239 Pileggi M, Pileggi S, et al. Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. *Chemosphere.* 2012; 86:1127–1132.
- 240 Vasileva-Tonkova E, Gesheva V. Biosurfactant production by antarctic facultative anaerobe *Pantoea* sp during growth on hydrocarbons. *Curr Microbiol.* 2007; 54:136–141
- 241 Wagner AJ, Rychnovsky SD. Determination of absolute configuration of secondary alcohols using thin-layer chromatography. *J Org Chem.* 2013; 78:4594–4598.
- 242 Jeewon R, Liew ECY, et al. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. *Fungal Diversity.* 2004; 17:39–55.
- 243 Wei JG, Xu T, et al. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae in southern China. *Fungal Diversity.* 2007; 24:55–74.
- 244 Koh JY, Shin GH, et al. Seasonal occurrence and development of grey blight of tea plants in Korea. *Plant Pathol J.* 2001; 17:40–44.
- 245 Douanla-Meli C, Langer E. *Pestalotiopsis theae* (Ascomycota, Amphispheariaceae) on seeds of *Diospyros crassiflora* (Ebenaceae). *Mycotaxon.* 2009; 107:441–448.
- 246 Lv C, Huang B, et al. Entomopathogenic Fungi on *Hemiberlesia pitysophila*. *PLoS One.* 2011; 8:e23649.
- 247 Kimura Y, Kouge A, et al. Pesthetoxin, a new phytotoxin produced by the gray blight fungus, *Pestalotiopsis theae*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998; 62:1624–1626.
- 248 Shimada A, Takahashib I, et al. Chloroisosulochrin, chloroisosulochrin dehydrate, and pestheic acid, plant growth regulators, produced by *Pestalotiopsis theae*. *Z Naturforsch.* 2001; 56b:797–803.
- 249 Erwei L, Lihua J, et al. Pestalachlorides A–C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. *Bioorg Med Chem.* 2008; 16:7894–7899.
- 250 Gang D, Lihua J, et al. Pestalazines and pestalamides, bioactive metabolites from the plant pathogenic fungus *Pestalotiopsis theae*. *J Nat Prod.* 2008; 71:1861–1865.
- 251 Xu X, Zhang F, et al. Identification of the first diphenyl ether gene cluster for pestheic acid biosynthesis in plant endophyte *Pestalotiopsis fici*. *Chembiotech.* 2014; 15:284–292.
- 252 Igarashi Y, Sekine A, et al. Anicequol, a Novel Inhibitor for Anchorage-independent Growth of Tumor Cells from *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx TP-F0213. *J Nat Antibio.* 2002; 55:371–376.
- 253 Schreiber D, Jung M, et al. 3'-Demethyl dihydromaldoxin and dihydromaldoxin, two anti-inflammatory diaryl ethers from a *Steganospora* species. *J Antibiot.* 2012; 65:473–477.
- 254 Siegler EH, Popenoe CH. Some insecticidal properties of the fatty acid series. *J Agri Res.* 1924; 19:259–261.
- 255 Siegler EH, Popenoe CH. The fatty acids as contact insecticides. *J Econom Entomol.* 1925; 18:292–299.
- 256 Tattersfield F, Gimmingham T. The insecticidal action of the fatty acids, their methyl esters and sodium and ammonium salts. In: Studies on contact insecticides.
- 257 Adebawale K, Adedire C. Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. *Afr J Biotech.* 2006; 5:901–906.
- 258 Ramsewak RS, Nair MG, et al. Insecticidal fatty acids and triglycerides from *Dirca palustris*. *J Agri Food Chem.* 2001; 49:5852–5856.
- 259 Rahuman AA, Venkatesan P, et al. Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. *Parasitology Research.* 2008; 103:1383–1390.
- 260 Figueroa-Brito R, Camino M, et al. Fatty acid composition and toxic activity of the acetonic extract of *Carica papaya* L. (Caricaceae) seeds. *Phyton Inter J Exp Bot.* 2002; 69:97–99.
- 261 Horsáková I, Voldřich M, et al. *Asaia* sp. as a Bacterium Decaying the Packaged Still Fruit Beverages. *Czech J Food Sci.* 2009; 27:362–365.
- 262 Moore JE, McCalmont M, et al. *Asaia* sp., an Unusual Spoilage Organism of Fruit-Flavored Bottled Water. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68:4130–4131.
- 263 Yamada Y, Katsura K, et al. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000; 50:823–829.
- 264 Favia G, Ricci I, et al. Bacteria of the Genus *Asaia*: A Potential Paratransgenic Weapon Against Malaria. In: Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Ed. Aksoy S. 2008. 627.
- 265 Favia G, Ricci I, et al. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104:9047–9051.
- 266 Nirma C, Eparvier V, et al. Reactivation of antibiosis in the entomogenous fungus *Chrysosporium* sp. SNB-CN74. *J Antibiot.* 2015; 68:586–590

- 267 Kusari S, Zuehlke S, et al. Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte on camptothecin biosynthesis. *J Nat Prod*. 2011; 74:764-775.
- 268 Yang JY, Sanchez LM, et al. Molecular networking as a dereplication strategy. *J Nat Prod*. 2013; 76:1686-1699.
- 269 Borthwick AD. 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. *Chem Rev*. 2012; 112:3641-3716.
- 270 Gäumann E, Roth S, et al. Enniatin, ein neues gegen mykobakterien wirksames antibiotikum. *Experientia*. 1947; 3:202-203.
- 271 Nilanonta C, Isaka M, et al. Unusual enniatins produced by the insect pathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum*: isolation and studies on precursor-directed biosynthesis. *Tetrahedron*. 2003; 59:1015-1020.
- 272 Tomoda H, Huang X, et al. Inhibition of acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase activity in cyclodepsipeptide antibiotics. *J Antibiot*. 1992; 45:1626-1632.
- 273 Wang Q, Xu L. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi; a short review. *Molecules*. 2012; 23:2367-2377.
- 274 Zhao S, Chen S, et al. Four new tetramic acid and one new furanone derivatives from the plant endophytic fungus *Neopestalotiopsis* sp. *FitoTerapia*. 2015; 103:106-112.
- 275 Halecker S, Surup F, et al. Hymenosetin, a 3-decalinoyltetramic acid antibiotic from cultures of the ash dieback pathogen, *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Phytochem*. 2014; 100:86-91.
- 276 Phillips MA, Croteau RB. Resin-based defenses in conifers. *Trends Plant Sci*. 1999; 4:184-190.
- 277 Langenheim JH. Higher-plant terpenoids—a phytocentric overview of their ecological roles. *J Chem Ecol*. 1994; 20:1223-1280.
- 278 Torres A, Dor I, et al. Characterization of surface n-alkanes and fatty acids of the epiphytic lichen *Xanthoria parietina*, its photobiont a green alga *Trebouxia* sp., and its mycobiont, from the Jerusalem hills. *Eur J Biochem*. 2003; 270:2120-2125.
- 279 Ayer WA, Macaulay JB. Metabolites of the honey mushroom, *Armillaria mellea*. *Can J Chem*. 1987; 65:7-14.
- 280 Costa MS, Rego A, et al. The conifer biomarkers dehydroabietic and abietic acids are widespread in Cyanobacteria. *Sci rep*. 2016; 6:23436.
- 281 Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect*. 2003; 5:535-544.
- 282 Zhang HW, Song YC, et al. Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod rep*. 2006; 23:753-771.
- 283 Cichewicz RH. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. *Nat Prod Rep*. 2010; 27:11-22.
- 284 Bertrand S, Schumpp O, et al. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *J Chromatogr*. 2013; 1292:219-228.
- 285 Hsu SC, Lockwood JL. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of *Actinomycetes* in water and soil. *Appl Microbiol*. 1975; 29:422-426.
- 286 Murphy N, Bleakley B. Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase-producing microorganisms. *Internet J Microbiol*. 2012; 10.
- 287 EUCAST, EUCAST DISCUSSION DOCUMENT E.Dis 5.1 Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiol Infect*. 2003; 9:1-7.
- 288 EUCAST, EUCAST definitive document E.Def 7.1 Method for the Determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clinical Microbiol Infect*. 2008; 14:398-405.
- 289 World Health Organization. 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13, 39 p.
- 290 Falkowski M, Jahn-Oyac A, et al. Assessment of A Simple Compound-Saving Method To Study Insecticidal Activity of Natural Extracts and Pure Compounds Against Mosquito Larvae. *J Am Mosq Control Assoc*. 2016; 32:337-340.
- 291 Abott WJ. *Econ Entomol*. 1925; 18: 265-267.
- 292 Grieco JP, Achee NL, et al. A novel high throughput screening system to evaluate the behavioral response of adult mosquito to chemicals. *J Am Mosq Contr Assoc*. 2005; 21:404-411.
- 293 Achee NL. Behavior modifying compounds for disease vector control. 2007.
- 294 Tempête C, Werner G, et al. In vitro cytostatic activity of 9-demethoxyprothramycin B. *Eur J Med Chem*. 1995; 30:647-650.