

UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ÉCOLE DOCTORALE CHIMIE BIOLOGIE

Année 2007

N° 17

Les peptaïbols, métabolites fongiques toxiques en milieu marin

Détection, quantification et implication pour la qualité de
l'environnement et la salubrité des coquillages

THÈSE DE DOCTORAT

Mention Sciences de la Vie et de la Santé

Discipline : Pharmacie

Spécialités : Chimie Analytique et Écotoxicologie marine

Présentée

et soutenue publiquement par

Laurence POIRIER

Le 24 septembre 2007, devant le jury ci-dessous

Président M. MINIER Christophe, *Professeur, Université du Havre*
Rapporteurs Mme LARTIGUE Claire, *Professeur, Université d'Auvergne*
M. VERITE Philippe, *Professeur, Université de Rouen*
Examineurs M. LE BIZEC Bruno, *Professeur, École Nationale Vétérinaire de Nantes*
Mme QUINIOU Françoise, *Chercheur, Ifremer, Centre de Brest*
Directeurs de thèse M. AMIARD Jean-Claude, *Directeur de recherche au CNRS,*
Université de Nantes
Mme MONTAGU Monique, *Professeur, Université de Nantes*

LISTE DES TRAVAUX ET PUBLICATIONS RELATIVES À CE TRAVAIL

PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES À COMITE DE LECTURE

Poirier L., Quiniou F., Ruiz N., Montagu M., Amiard J.C., Pouchus Y.F. 2007. Toxicity assessment of peptaibols and contaminated sediments on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 83, 254-262.

Poirier L., Amiard J.C., Mondeguer F., Quiniou F., Ruiz N., Pouchus Y.F., Montagu M. 2007. Determination of peptaibol trace amounts in marine sediments by liquid chromatography / electrospray ionization - ion trap - mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1160, 106-113

Poirier L., Montagu M., Landreau A., Mohamed-Benkada M., Grovel O., Sallenave-Namont C., Biard J.F., Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Pouchus Y.F. 2007. Peptaibols, stable markers of fungal development in the marine environment. *Chem. Biodiv.* 4, 1116-1128

Ruiz N., Wielgosz-Collin G., **Poirier L.**, Grovel O., Petit K.E., Mohamed-Benkada M., Robiou du Pont T., Bissett J., Vérité P., Barnathan G., Pouchus Y.F. 2007. New Trichobrachins, 11-residue peptaibols from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*. *Peptides*, sous presse.

COMMUNICATIONS ORALES DANS DES CONGRES INTERNATIONAUX

Poirier L., Montagu M., Amiard J.C., Berthet N., Mondeguer F., Pouchus Y.F. 2007. Peptaibols: toxic fungal metabolites in coastal areas. Quantification in sediments and evaluation of embryotoxicity. *17th SETAC Europe Annual Meeting - Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 20-24 mai 2007, Porto, Portugal*

Poirier L., Montagu M., Amiard J.C., Ruiz N., Mondeguer F., Pouchus Y.F. 2006. Peptaibols: toxic fungal metabolites in marine environment - Development of a quantification method in marine sediments using LC / ESI MS. *1st International Symposium on Food, Veterinary and Medical Applications of Antimicrobial Peptides, 21-23 juin 2006, Nantes, France*

Ruiz N., **Poirier L.**, Wielgosz-Collin G., Mohamed-Benkada M., Robiou Du Pont T., Montagu M., Biard J-F., Barnathan G., Pouchus Y.F. 2005. Short peptaibols: cytotoxic metabolites from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*. *4th European Conference on Marine Natural Products, 12-16 septembre 2005, MNHM, Paris, France*

COMMUNICATIONS ORALES DANS DES CONGRES NATIONAUX

Poirier L., Quiniou F, Ruiz N., Le Goff M., Montagu M, Amiard J.C., Pouchus Y.F. 2006. Évaluation de la toxicité des peptaibols sur le développement embryo-larvaire de *Crassostrea gigas*. *31^{ème} congrès annuel de l'Union des Océanographes Français, 2-3 novembre 2006, Nantes, France*

Poirier L., Montagu M., Amiard J.C., Berthet N., Mondeguer F., Pouchus Y.F. 2006. Quantification des peptaibols, métabolites fongiques toxiques, dans les sédiments marins et les mollusques bivalves par CLHP / SM. *23^{èmes} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, 11-14 septembre 2006, Nantes, France*

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
CHAPITRE II : LES PEPTAÏBOLS	5
II.1. DÉFINITION ET CLASSIFICATION	5
II.2. DIVERSITÉ ET CARACTÉRISTIQUES STRUCTURALES DES PEPTAÏBOLS	7
II.2.1. <i>Structure primaire</i>	7
II.2.1.1. Les peptaïbols à longue séquence.....	9
II.2.1.2. Les peptaïbols à courte séquence.....	12
II.2.2. <i>Structure secondaire</i>	15
II.3. BIOSYNTHÈSE	17
II.3.1. <i>Origine biologique</i>	17
II.3.2. <i>Voie de biosynthèse</i>	18
II.4. PROPRIÉTÉS MEMBRANAIRES ET BIOLOGIQUES DES PEPTAÏBOLS	22
II.4.1. <i>Interaction des peptaïbols avec les membranes cellulaires</i>	22
II.4.1.1. Formation des canaux transmembranaires	22
II.4.1.2. Caractéristiques des canaux transmembranaires	24
II.4.1.3. Relations structures/activités.....	27
II.4.2. <i>Activités biologiques</i>	28
II.4.2.1. Activité antibactérienne	28
II.4.2.2. Activité antivirale	29
II.4.2.3. Activité antiprotozoaire	29
II.4.2.4. Activité antifongique	29
II.4.2.5. Interaction avec les cellules ou les organismes animaux	30
II.5. MÉTHODOLOGIES D'ANALYSE DES PEPTAÏBOLS.....	32
II.5.1. <i>Production et isolement</i>	32
II.5.2. <i>Identification et analyse séquentielle</i>	33
II.5.2.1. Méthodes utilisées.....	33
II.5.2.2. Étude séquentielle des peptaïbols par SM	34

CHAPITRE III : DÉTECTION ET IDENTIFICATION DES PEPTAÏBOLS DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN.. 39

III.1.	CONTEXTE DE L'ÉTUDE	39
III.2.	RECHERCHE DES PEPTAÏBOLS DANS LES ÉCHANTILLONS DU FIER D'ARS	41
III.2.1.	<i>Localisation géographique et caractéristiques du site de prélèvement</i>	41
III.2.2.	<i>Détection et identification des peptaïbols par spectrométrie de masse</i>	42
III.2.2.1.	Présentation du spectromètre à électronébulisation et trappe d'ions (ES-TI)	43
III.2.3.	<i>Article 1</i>	49

"Peptaïbols: stable markers of fungal development in the marine environment"

III.3.	CONCLUSIONS	62
--------	-------------------	----

CHAPITRE IV : DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES D'ANALYSE QUANTITATIVE DES PEPTAÏBOLS DANS LES SÉDIMENTS MARINS ET LES MOLLUSQUES BIVALVES 65

IV.1.	CONTEXTE DE L'ÉTUDE	65
IV.2.	OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DÉTECTION DES PEPTAÏBOLS PAR SM-ES-TI	66
IV.2.1.	<i>Choix du composé « étalon »</i>	67
IV.2.2.	<i>Choix du mode de détection des ions</i>	67
IV.2.3.	<i>Choix du solvant de solubilisation</i>	69
IV.2.4.	<i>Choix du mode d'analyse</i>	72
IV.2.5.	<i>Optimisation des paramètres instrumentaux</i>	74
IV.3.	DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE QUANTIFICATION DES PEPTAÏBOLS DANS LA MATRICE SÉDIMENTAIRE	76
IV.3.1.	<i>Introduction</i>	76
IV.3.2.	<i>Article 2</i>	78

"Determination of peptaïbol trace amounts in marine sediments by liquid chromatography/electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry"

IV.3.3.	<i>Conclusions</i>	86
IV.4.	DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE QUANTIFICATION DES PEPTAÏBOLS DANS LES ORGANISMES BIVALVES	89
IV.4.1.	<i>Matériels et méthodes</i>	89
IV.4.1.1.	Optimisation de l'extraction et de la purification des peptaïbols dans la matrice « moule »	89
IV.4.1.2.	Adaptation de la méthode de dosage par CLHP/SM-ES-TI aux extraits de moules	92
IV.4.2.	<i>Résultats et Discussion</i>	94
IV.4.2.1.	Choix des conditions d'extraction et de purification	94
IV.4.2.2.	Quantification des peptaïbols dans la matrice « moule »	96
IV.4.3.	<i>Conclusions</i>	98

CHAPITRE V : ÉVALUATION DE L'EMBRYOTOXICITÉ DES PEPTAÏBOLS ET DES SÉDIMENTS CONTAMINÉS POUR L'HUÎTRE CREUSE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	101
V.1. INTRODUCTION - CONTEXTE	101
V.2. ARTICLE 3.....	106
<i>"Toxicity assessment of peptaibols and contaminated sediments on Crassostrea gigas embryos"</i>	
V.3. CONCLUSIONS.....	115
CHAPITRE VI : CONCLUSIONS GÉNÉRALES - PERSPECTIVES	117
BIBLIOGRAPHIE	123
ANNEXES	145

LISTE DES FIGURES

Figure II.1 : Pourcentage des différents peptaïbols à longue séquence en fonction du nombre de résidus (n) dans la séquence peptidique.....	9
Figure II.2 : Pourcentage des différents peptaïbols à courte séquence en fonction du nombre de résidus (n) dans la séquence peptidique.....	13
Figure II.3 : Schéma des liaisons hydrogène caractérisant les hélices α et 3_{10}	15
Figure II.4 : Comparaison des structures cristallines de l'alaméthicine F30 (A) et de l'antiamoebine (B). Les résidus Pro sont indiqués en noir et les résidus Aib en gris (d'après Biochemical Society Transactions).	16
Figure II.5 : Importance des différents genres de champignons dans la biosynthèse des peptaïbols	18
Figure II.6 : Structure modulaire de la peptide synthétase Tex1 (d'après Wiest <i>et al.</i> , 2002).....	20
Figure II.7 : Biosynthèse de l'ampullosporine A par une peptide synthétase (modèle proposé par Reiber <i>et al.</i> , 2003).	21
Figure II.8: Interaction des peptaïbols avec les membranes biologiques et formation des canaux transmembranaires, d'après Sato et Feix (2006).....	24
Figure II.9 : Modèle du canal formé par l'antiamoebine I, d'après O'Reilly et Wallace (2003).	26
Figure II.10 : Voies de fragmentations principales des peptides par spectrométrie de masse SM ⁿ (d'après De Hoffmann et Stroobant, 2005).	35
Figure II.11 : Fragments résultant du clivage préférentiel de la liaison Aib-Pro (d'après Hlimi, 1997).	36
Figure III.1 : Localisation du Fier d'Ars. Carte d'après Bel Hassen (2001).	41
Figure III.2 : Configuration éclatée du spectromètre de masse LCQ TM , équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation et d'une trappe ionique quadripolaire, d'après ThermoFinnigan Corporation.	43
Figure III.3 : Représentation schématique du processus de l'électronébulisation pour la formation des ions positifs (d'après Bökman, 2002).	45
Figure IV.1 : Spectres (courant ionique total) du mélange d'alaméthicines observés en mode de détection (a) des ions négatifs, (b) des ions positifs.....	68
Figure IV.2 : Influence du solvant de solubilisation sur la nature et la distribution de l'état de charge des ions formés en phase gazeuse par l'alaméthicine.....	70
Figure IV.3 : Spectres (courant ionique total) obtenus après perfusion de solutions d'alaméthicines solubilisées avec : a) un mélange acétonitrile/eau 75 :25 v/v ; b) de l'acétonitrile 100%, c) un mélange méthanol/eau 75 :25 v/v, d) du méthanol 100%.	71
Figure IV.4 : Comparaison des modes SM Full Scan (a, c) et Zoomscan (b, d) pour l'analyse de l'alaméthicine F50/5 par CLHP/SM-ES-TI.	73
Figure IV.5 : Répartition du nombre de peptaïbols à longue séquence décrits en fonction des rapports m/z de l'adduit sodique bichargé $[M+2Na]^{2+}$ formé par ces molécules.....	74

Figure IV.6 : Optimisation du signal de l'adduit sodique bichargé $[M+2Na]^{2+}$ en SM-ES-TI obtenu par perfusion de solutions d'alaméthicides solubilisées dans un mélange méthanol/eau 75 :25 v/v ou du méthanol.	75
Figure IV.7: Carte de localisation des trois sites ateliers du programme Morest : la baie des Veys, la rivière d'Auray et le bassin de Marennes Oléron.	77
Figure IV.8 : Développement du protocole d'extraction des peptaïbols à partir de la matrice « moule ».	91
Figure IV.9 : Conditions chromatographiques (nature et débit de la phase mobile) mises au point pour l'analyse des peptaïbols dans les extraits purifiés de moules : a) paramètres d'élution, b) représentation du gradient d'élution en fonction du temps.	93
Figure IV.10: Influence du mode de dépôt de l'extrait lors de la purification sur : a) la récupération du standard ; b) le pourcentage d'impuretés coéluées ^a	95
Figure IV.11 : Quantification des peptaïbols dans la matrice "moule" par CLHP/SM-ES-TI, chromatogrammes et spectres de masse du standard d'alaméthicides F50 (500 ng.mL ⁻¹).	96
Figure IV.12: Courbes de calibrations obtenues par étalonnage externe et par la méthode des ajouts dosés dans la matrice « moule ».	97
Figure V.1 : Différentes anomalies du développement embryo-larvaire chez l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> . a : larve D normale, b : anomalies du manteau (hypertrophie), c : anomalies de la charnière et de la coquille, d : anomalies du développement (blocage au stade embryonnaire).	103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau II.1 : Classification des peptaïbiotiques.....	6
Tableau II.2 : Codes, masses et structures des acides aminés rentrant dans la composition des peptaïbols.....	8
Tableau II.3 : Peptaïbols à longue séquence.....	10
Tableau II.4 : Séquences des différents analogues de l'alaméthicine.....	12
Tableau II.5 : Peptaïbols à courte séquence.....	14
Tableau IV.1: Paramètres du spectromètre de masse optimisés pour la quantification des peptaïbols à longue séquence dans la matrice de moules.....	94
Tableau IV.2 : Méthode de calibration par ajouts dosés (matrice « moule ») : justesse et fidélité.....	98

LISTE DES ABREVIATIONS

Les codes 1 et 3 lettres des acides aminés constitutifs des peptaïbols sont détaillés dans le Tableau II.2 (p. 8).

A	Adénylation
Ac	Acétyl
Aol	Alaninol
C	Condensation
CE ₅₀	Concentration efficace entraînant 50% d'anomalies larvaires
CID	<i>Ion source collision induced dissociation</i>
CIT	Courant ionique total
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CRM	<i>Consecutive reaction monitoring</i>
DL ₅₀	Dose entraînant la mort de 50% des individus
ES	<i>Electrospray</i>
EtNor	α-ethyl-norvaline
FAB	<i>Fast atom bombardement</i>
Fol	Phénylalaninol
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
IFREMER	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
Iol	Isoleucinol
IR	Infrarouge
Jol	Isovalinol
LD	Limite de détection
Lol	Leucinol
LQ	Limite de quantification
Lx	Leucine/Isoleucine
Lxol	Leucinol/Isoleucinol
M	Masse moléculaire
<i>m/z</i>	Rapport de masse/charge
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MCoA	Malonyl-Coenzyme A
MeOH	Méthanol
MePro	Méthylproline
MMS	Mycothèque marine du SMAB
NRPS	<i>Non ribosomal peptide synthetase</i>
PCB	Polychlorobiphényl

Pip	Acide pipecolique
PKS	<i>Polyketide synthase</i>
REMORA	Réseau mollusques des rendements aquacoles
REPHY	Réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SIM	<i>Selected ion monitoring</i>
SM	Spectrométrie de masse
Sol	Sérinol
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
SRM	<i>Selected reaction monitoring</i>
T	Thiolation
TDM	4,4 tétraméthyl-diamino-diphényl méthane
TI	Trappe d'ions
t_R	Temps de rétention
UA	Unité arbitraire
Uol	Acide α -aminoisobutanol
UV	Ultraviolet
v/v	volume à volume
Vol	Valinol
Vx	Valine/Isovaline
Vxol	Valinol/Isovalinol
Wol	Tryptophanol

Chapitre I
Introduction

Chapitre I : INTRODUCTION

Exploitant environ 20 000 hectares du domaine maritime français, la conchyliculture représente un secteur d'activité très important avec une production moyenne de 200 000 tonnes de coquillages par an pour un chiffre d'affaire de l'ordre de 630 millions d'euros (Comité National de la Conchyliculture, 2006). Au sein de cette filière, l'ostréiculture, avec en moyenne 130 000 tonnes d'huîtres annuelles, représente environ 67 % de la production, elle occupe la première place européenne et la 4^{ème} place mondiale après la Chine, le Japon et la Corée. Les français sont de surcroît les premiers consommateurs au monde d'huîtres à l'état frais (2 kg par an et par habitant) et sont aussi de grands amateurs de moules avec une consommation qui dépasse largement la production nationale, avec près de 120 000 tonnes.

En raison de l'importance de cette filière et des phénomènes d'intoxication alimentaire liés à la consommation de ces coquillages, leur ramassage et leur mise sur le marché sont sous l'étroite surveillance de l'IFREMER (Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer). Dans la plupart des cas, les toxines responsables de ces intoxications appartiennent au groupe des phycotoxines, toxines produites par des microalgues marines et bioaccumulées par les mollusques. Les espèces phytoplanctoniques présentes dans les eaux côtières françaises et les phycotoxines accumulées par les coquillages sont donc suivies par le biais du réseau REPHY (Réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines) de l'IFREMER dans un cadre réglementaire strict. La recherche des toxines bioaccumulées est réalisée par des tests biologiques sur souris et par des analyses chimiques.

Dans le cadre de cette surveillance, il a été noté, depuis 1992, plusieurs épisodes de toxicité de coquillages, révélés par une positivité du test sur souris et pour lesquels aucune cause précise n'a pu être identifiée (Amzil *et al.*, 1996). Les analyses physico-chimiques et biologiques développées n'ont pas fourni d'explication à l'occurrence de tels épisodes : absence de phytoplancton, de bactéries toxigènes et faibles concentrations en contaminants chimiques inorganiques (Zn, Pb, Cd, Hg) et organiques (HAP, PCB). Ces observations ont été notées suite à l'analyse d'extraits de coquillages en provenance du Pertuis Breton, de l'étang de Salses Leucate, de la rade de Toulon, du Croisic, des bassins de Marennes Oléron, d'Arcachon et de Normandie (Afssa, 2006). D'autre part, des épisodes de mortalités anormales ont été enregistrés en 1997 et 1998 dans les populations de coques du Croisic (*Cerastoderma edule*) (Thebault, 2001). Dans le cadre du réseau REMORA (Réseau mollusques des rendements aquacoles) d'IFREMER chargé de la surveillance de la croissance des huîtres creuses, des taux élevés de mortalités d'adultes et de juvéniles ont également été observés depuis 1993 sur le littoral français, particulièrement en période estivale. Des zones, comme la baie des Veys en Normandie, semblent particulièrement touchées par ces épisodes, sans qu'une cause puisse être précisément identifiée (Cornette *et al.*, 2000).

Pour expliquer ces phénomènes, l'hypothèse d'une contamination par des toxines fongiques produites par des moisissures se développant en milieu marin a été formulée par notre équipe.

La présence de moisissures en milieu marin est en effet un fait reconnu depuis de nombreuses années (Barghoorn et Linder, 1944 ; Brisou, 1975 ; Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979). De nombreuses recherches ont ainsi mis en évidence la présence de moisissures filamenteuses dans des échantillons d'eau de mer (Wright Steele, 1967 ; Miao et Qian, 2005), de sédiments ou de sables (Rees et Jones, 1985 ; Abd-Elaah, 1998 ; Burtseva *et al.*, 2003 ; Bhatt *et al.*, 2006), et d'organismes marins (Numata *et al.*, 1993 ; Takahashi *et al.*, 1996). Leur développement a notamment été mis en évidence par l'observation d'hyphes de micromycètes symbiotiques ou parasites sur des éponges et des coraux (McClanahan *et al.*, 2004 ; Golubic *et al.*, 2005). Landy et Jones (2006) ont récemment établi une liste compilant toutes les espèces de champignons présentes dans les écosystèmes marins de l'Europe.

Au sein de l'environnement marin, deux types de champignons sont distingués : les champignons marins facultatifs, provenant du milieu terrestre ou d'eaux douces et qui sont capables de se développer et éventuellement de sporuler en milieu marin, et les champignons marins obligatoires qui ne peuvent se développer qu'en milieu marin (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979). Parmi les souches isolées, certaines appartiennent à des genres connus en milieu terrestre pour leur fort pouvoir toxigène. Cependant, l'aptitude de ces moisissures d'origine marine à produire des mycotoxines n'a été que très peu étudiée. Selon Cuomo *et al.* (1995), un plus grand nombre de souches biologiquement actives sont isolées du milieu marin en comparaison au milieu terrestre. De manière générale, les métabolites produits par ces souches présentent, de plus, une activité antimicrobienne plus importante. Les moisissures d'origine marine représentent ainsi une source importante de nouveaux composés biologiquement actifs (Christophersen *et al.*, 1999 ; Sponga *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2003), et peuvent également constituer un risque toxique potentiel pour les organismes marins.

Pour étudier l'hypothèse qu'une origine fongique puisse expliquer, de façon partielle ou totale, les phénomènes de toxicité observés chez certains bivalves, la biodiversité fongique des zones conchylicoles a été étudiée lors de la thèse de doctorat de C. Sallenave (Sallenave, 1999). Lors de ce travail, 456 souches de micromycètes filamenteux, représentant une douzaine de genres différents, ont été isolées à partir d'échantillons d'eau de mer, de sédiments et d'organismes bivalves prélevés sur six sites de l'estuaire de la Loire (Sallenave-Namont *et al.*, 2000). Les quatre principaux genres isolés étaient *Penicillium* (47%), *Trichoderma* (10%), *Cladosporium* (6%) et *Aspergillus* (5%). Ces quatre genres sont des champignons supérieurs connus pour leur production de métabolites secondaires toxiques en milieu terrestre. Leur capacité toxigène a donc été examinée à l'aide de différents tests biologiques (test sur larves de diptères, test sur *Artemia salina* et test hémolytique), mettant en évidence l'importante toxicité d'une souche d'*Aspergillus fumigatus* isolée de sédiments collectés au niveau du Port Giraud (Loire Atlantique, France), et d'une souche de *Trichoderma koningii* Oudemans isolée de coques prélevées dans le Traict du Croisic (Loire Atlantique).

En 1993, 108 intoxications alimentaires (dont 3 mortelles) ont été recensées après consommation de moules cultivées, provenant de l'île du Prince Edward (Canada). Bien qu'aucune relation n'ait été trouvée entre cette toxicité (identifiée par la suite comme étant due à l'acide domoïque) et la microfonge isolée, il a cependant été noté une forte prédominance du genre *Trichoderma* dans les tissus de moules incriminées (Brewer *et al.*, 1993). Face à ces observations, la souche de *T. koningii* Oudemans a fait l'objet d'études plus approfondies afin de caractériser sa production de toxines, d'identifier les métabolites produits et d'évaluer les effets biologiques liés à une contamination de coquillages (Landreau *et al.*, 2002). Après isolement et purification, les métabolites responsables de cette toxicité ont été identifiés comme appartenant à la famille des peptaïbols, famille de peptides à activité antimicrobienne. Ces peptides sont exclusivement synthétisés par les champignons, et principalement par ceux du genre *Trichoderma*. Ils sont connus pour créer des pores dans les membranes cellulaires, induisant des désordres physiologiques importants. De nombreuses études visant à examiner l'activité de ces toxines leur ont notamment attribué des propriétés cytotoxiques, hémolytiques et neurotoxiques (Fujita *et al.*, 1994 ; Solfrizzo *et al.*, 1994 ; Beven *et al.*, 1998 ; Szekeres *et al.*, 2005). Des essais de contamination expérimentale ont, de plus, démontré la bioaccumulation de ces métabolites par une espèce de mollusques bivalves filtreurs (*Mytilus edulis*) (Sallenave-Namont *et al.*, 1999 ; Landreau *et al.*, 2002). Lors de ces expérimentations, des peptaïbols ont été ponctuellement détectés dans des lots de moules témoins, attestant d'une contamination naturelle préalable.

Suite à ces différents travaux et au regard des propriétés toxicologiques de ces composés, différentes questions restaient en suspens. Si la présence de moisissures productrices de peptaïbols dans l'environnement marin peut représenter un risque toxique pour les mollusques bivalves et les consommateurs humains, leur isolement, effectué à partir de spores, ne prouve pas leur développement dans ce milieu. D'autre part, aucune étude visant à explorer la présence des peptaïbols dans des échantillons du milieu naturel n'a été réalisée, les concentrations environnementales ne sont donc pas connues. La recherche d'une corrélation entre ces concentrations et les paramètres toxicologiques des peptaïbols représente toutefois un objectif majeur dans le développement des connaissances sur ces mycotoxines et sur leur implication potentielle dans les phénomènes de toxicité observés chez les bivalves. C'est dans ce cadre que s'inscrit cette étude, dont l'objectif à long terme est d'estimer le risque sanitaire lié à la présence de tels métabolites dans les zones de conchyliculture.

Ce manuscrit débute par une étude bibliographique et s'articule ensuite autour de trois axes correspondant aux trois parties principales constitutives de notre travail. Ces trois axes permettront, tour à tour, de définir l'exposition des organismes marins à ces métabolites fongiques, de mettre au point des méthodes permettant l'évaluation de leur imprégnation et enfin d'estimer les effets de cette imprégnation sur les premiers stades de vie des organismes.

L'étude bibliographique présentera les différentes caractéristiques structurales des peptaïbols, leurs propriétés membranaires et biologiques et les méthodes actuelles utilisées pour l'analyse de ces métabolites.

Dans le but d'évaluer le développement des moisissures saprotrophes productrices de peptaïbols dans l'environnement marin, une recherche de ces métabolites a été effectuée dans des échantillons de sédiments et de moules prélevés dans une zone conchylicole, où une toxicité élevée et inexpliquée des éluviats sédimentaires a été observée pour le développement embryo-larvaire de la moule *Mytilus edulis*. Les résultats obtenus lors de cette étude feront l'objet de la première partie de ce manuscrit.

Afin d'être en mesure de caractériser le lien entre les molécules détectées et leur potentiel toxique, il était nécessaire de pouvoir déterminer précisément leurs quantités dans les matrices naturelles. La seconde partie s'articulera autour du développement de méthodes d'analyses quantitatives de ces molécules dans les matrices environnementales (sédiments et moules) à l'aide du couplage chromatographie liquide haute performance (CLHP) / spectrométrie de masse (SM) à ionisation par électrobulisaison (electrospray, ES), méthodes permettant une caractérisation précise des concentrations trouvées en milieu marin.

Dans un dernier temps, afin d'évaluer les risques toxiques liés à la présence de peptaïbols dans les écosystèmes marins, des bioessais réalisés sur les embryons de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, représentant les stades critiques pour la survie d'une espèce, seront exposés dans une troisième partie. Les effets biologiques des peptaïbols détectés en milieu marin et des sédiments contaminés seront ainsi évalués, permettant d'estimer l'impact de ces molécules pour la dynamique de population des bivalves.

Chapitre II
Les peptaïbols

Chapitre II : LES PEPTAÏBOLS

II.1. Définition et classification

Les peptaïbols sont de petits peptides linéaires produits par diverses espèces de champignons filamenteux d'origine terrestre ou marine. Le terme peptaïbol a été proposé dans les années 1980 par Benedetti *et al.* (1982) et Brückner (1983) pour définir les peptides linéaires à activité antibiotique caractérisés, d'une part, par la présence d'acides aminés originaux α,α -dialkylés tels que l'acide α -aminoisobutyrique (α -méthyl alanine, Aib) et l'isovaline (α -éthyl alanine, Iva) et d'autre part, par un résidu C-terminal amino alcool.

En 1991, suite à l'identification croissante de nouvelles séquences, Brückner *et al.* ont introduit le terme de peptaïbiotiques afin de définir les molécules présentant les caractéristiques structurales des peptaïbols mais pour lesquelles l' amino alcool en C-terminal n'était pas défini. Neuf sous-familles de peptaïbols et peptaïbiotiques, basées sur l'enchaînement des acides aminés, ont été définies par Chugh et Wallace (Chugh et Wallace, 2001). Une base de donnée en ligne répertoriant les différentes séquences connues a également été créée (Whitmore *et al.*, 2003 ; Whitmore et Wallace, 2004).

Aujourd'hui, les peptaïbols sont considérés comme une sous-classe de la famille des peptaïbiotiques (Degenkolb *et al.*, 2003). Les peptaïbiotiques définissent les peptides linéaires antibiotiques présentant les caractéristiques structurales suivantes (Degenkolb *et al.*, 2003 ; Degenkolb *et al.*, 2006a) :

- une masse moléculaire comprise entre 500 et 2200 Da,
- une forte proportion d'acide α -aminoisobutyrique pouvant représenter jusqu'à 50% des résidus (Toniolo *et al.*, 1983),
- des acides aminés non codés et/ou lipoaminés,
- une extrémité N-terminale acylée,
- et une extrémité C-terminale constituée soit d'un résidu 2-amino alcool libre ou substituée par un groupe méthoxy, soit d'une amine, un amide, un acide aminé libre, une piperazine-dione ou un sucre-alcool.

Les différentes sous-classes de composés définies au sein des peptaïbiotiques sont présentées dans le Tableau II.1. Les peptaïbols, avec 425 séquences décrites, représente la sous-classe majoritaire (75% des peptaïbiotiques). Leur spécificité est l'acétylation du résidu N-terminal et l' amino alcool libre en C-terminal. Les particularités structurales et biologiques de ces molécules seront détaillées dans la suite de ce manuscrit.

La deuxième sous-classe est celle des lipopeptaïbols. L'extrémité N-terminale de ces peptaïbiotiques est acylée par un acide gras constitué d'un minimum de 5 carbones. Leur séquence peptidique est composée de 6 à 10 acides aminés et l'extrémité C-terminale est un amino alcool libre (Toniolo *et al.*, 2001). Cette sous-classe inclut les lipopubescines et les lipostrigocines (Degenkolb *et al.*, 2006a), les peptides LP237-F5 à F7 (Tsantrizos *et al.*, 1996), les trichodecenines (Fujita *et al.*, 1994), la trichogine IV (Auvin-Guette *et al.*, 1992) ainsi que les trikoningines KB (Auvin-Guette *et al.*, 1993).

La troisième sous-classe correspond aux lipoaminopeptides, molécules caractérisées par un acide gras α -méthylé en extrémité N-terminale et par l'absence du résidu amino alcool libre en C-terminal. De nombreux acides lipoaminés sont également présents dans la séquence de ces peptides. Les lipoaminopeptides comprennent les acremostatines (Degenkolb *et al.*, 2002), les helioferines (Gräfe *et al.*, 1995), les leucinostatines (Radics *et al.*, 1987), la lypohexine I (Heinze *et al.*, 1997), les roseoferines (Degenkolb *et al.*, 2000), la texenomycine A (Grigoriev *et al.*, 2002), les trichoferines (Degenkolb *et al.*, 2006b) et les trychopolynes (Fujita *et al.*, 1981 ; Iida *et al.*, 1999).

Au sein des peptaïbiotiques, 8% des séquences décrites ne peuvent être ordonnées dans une de ces trois sous-classes. Leur extrémité N-terminale est acétylée mais le C-terminal n'est pas formé d'un amino alcool libre. Ces « autres peptaïbiotiques » incluent la cervinine 2 (Wilhelm *et al.*, 2004), les néofrapeptines (Fredenhagen *et al.*, 2006), les efrapeptines (Gupta *et al.*, 1991 ; Gupta *et al.*, 1992), le peptide XR586 (Sharman *et al.*, 1996), les pseudokinines (Rebuffat *et al.*, 2000) et les trichocompactines (Degenkolb *et al.*, 2006b).

Tableau II.1 : Classification des peptaïbiotiques.

	Caractéristiques structurales			Nombre de séquences décrites	Pourcentage des peptaïbiotiques
	N-terminal	C-terminal	Résidus particuliers		
Peptaïbols	Acétylé	Amino alcool libre	Aib, Iva, Hyp	425	75%
Lipopeptaïbols	Acide gras	Amino alcool libre	Aib, Iva, EtNor	28	5%
Lipoaminopeptides	Acide gras α -méthylé	Amino alcool substitué, amine, amide, acide aminé	Aib, Iva, MePro, Hyleu, acides lipoaminés	69	12%
Autres	Acétylé	Amino alcool substitué, amine, amide, acide aminé, piperazine-dione, sucre-alcool	Aib, Iva, Hyp, Pip	43	8%

Aib : acide α -aminoisobutyrique, Iva : isovaline, Hyp : hydroxyproline, EtNor : α -éthyl-norvaline, MePro : méthylproline, Pip : acide pipercolique

II.2. Diversité et caractéristiques structurales des peptaïbols

II.2.1. Structure primaire


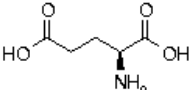

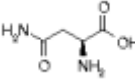
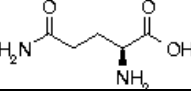
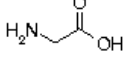
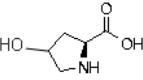
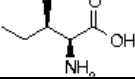
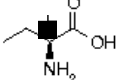
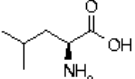
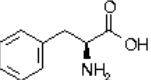
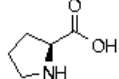
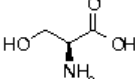
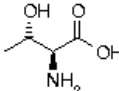
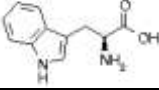
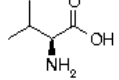
Les peptaïbols sont constitués d'un enchaînement d'acides aminés liés entre eux par des liaisons amides dites peptidiques. Une extrémité de la chaîne ainsi formée est porteuse d'une fonction amine acétylée, l'extrémité N- terminale, et l'autre d'une fonction alcool, l'extrémité C-terminale.

Treize acides aminés codés et trois non codés rentrent dans la composition des peptaïbols (Tableau II.2). A l'exception des résidus Gly et Aib qui ne possèdent pas de carbone asymétrique, ces acides aminés sont pour la plupart de configuration L sauf l'isovaline qui peut être trouvée sous la forme D (Hlimi *et al.*, 1995 ; Jaworski et Brückner, 2000).

Dans la suite de ce manuscrit, la position des acides aminés dans la séquence peptidique sera indiquée en exposant (ex : glutamine en position 18 = Gln¹⁸).

En fonction de la longueur de la chaîne peptidique, deux groupes de peptaïbols sont distingués: les peptaïbols à longue séquence, incluant 18 à 20 résidus et ceux à courte séquence principalement constitués de 11 à 16 résidus (Rebuffat *et al.*, 2000 ; Whitmore et Wallace, 2004). Les structures primaires des molécules constituant chacun de ces groupes ont été répertoriées à partir de la base de données en ligne (Whitmore *et al.*, 2003 ; Whitmore et Wallace, 2004) et de la littérature. Leurs masses moléculaires ont été déterminées et sont présentées en annexes 1 et 2. Ces informations seront utiles pour les analyses qualitatives et quantitatives conduites dans la suite de ce manuscrit.

Tableau II.2 : Codes, masses et structures des acides aminés rentrant dans la composition des peptaïbols.

Acide aminé	Code 1 lettre	Code 3 lettres	Structure	M (Da)	Masse chimique du résidu [M-H ₂ O] (Da)
Acide α-aminoisobutyrique*	U	Aib		103,06	85,05
Acide glutamique	E	Glu		147,13	129,11
Alanine	A	Ala		89,09	71,08
Asparagine	N	Asn		132,12	114,10
Glutamine	Q	Gln		146,15	128,13
Glycine	G	Gly		75,07	57,05
Hydroxyproline*	O	Hyp		131,06	113,04
Isoleucine	I	Ile		131,18	113,16
Isovaline*	J	Iva		117,15	99,13
Leucine	L	Leu		131,18	113,16
Phénylalanine	F	Phe		165,19	147,18
Proline	P	Pro		115,13	97,12
Sérine	S	Ser		105,09	87,08
Thréonine	T	Thr		119,12	101,10
Tryptophane	W	Trp		204,23	186,21
Valine	V	Val		117,15	99,13

* Acide aminé non codé

II.2.1.1. Les peptaïbols à longue séquence

a. Généralités

Parmi les peptaïbols isolés des différentes souches fongiques, ceux à longue séquence sont les plus largement rencontrés (Rebuffat *et al.*, 1999). De nombreuses études sur leurs structures et leurs activités biologiques ont ainsi été réalisées ; ils représentent 54 % des séquences de peptaïbols décrits jusqu'ici.

Les principales caractéristiques structurales et les souches productrices des différents sous-groupes de peptaïbols à longue séquence sont résumées dans le Tableau II.3. Ces peptaïbiotiques sont formés de 18 à 20 résidus et présentent des masses moléculaires comprises entre 1689 et 2004 Da. Leur séquence peptidique inclut des résidus hautement conservés tels qu'une proline en position 13 ou 14, une glutamine ou un acide glutamique en position 6 ou 7 et aussi avant l' amino alcool C-terminal. L' amino alcool peut être un valinol / isovalinol (Vol/Jol), un leucinol / isoleucinol (Lol/Iol), un phénylalaninol (Fol) ou un tryptophanol (Wol). Au sein de ce groupe, les peptides à 18 et 20 résidus représentent 89% des molécules décrites jusqu'ici (Figure II.1).

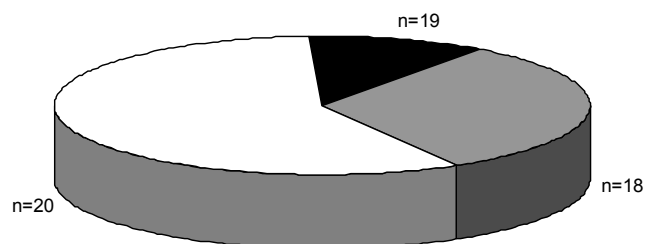


Figure II.1 : Pourcentage des différents peptaïbols à longue séquence en fonction du nombre de résidus (n) dans la séquence peptidique.

Tableau II.3 : Peptaïbols à longue séquence.

Les résidus conservés sont surlignés, en gris clair pour les résidus Glu/Gln et en gris foncé pour la Pro.

Sous-groupe	Souche productrice	Position																				Nombre de résidus	Nombre de séquences		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20				
Hypomurocine B	<i>Hypocrea muroiana</i>	Ac	U	S	A	L	U	Q	U	V	U	G	U	U	P	L	U	U	Q	Vol		18	6		
Neoatroviridine	<i>Trichoderma atroviride</i>	Ac	U	G	A	L	U	Q	U	L	U	G	J	U	P	L	U	U	Q	Lxol		18	4		
Saturnisporine SA IV	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	Ac	U	A	U	A	U	Q	U	L	U	G	U	U	P	V	J	Q	Q	Fol		18	1		
Trichokindine	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	S	A	U	U	Q	U	L	U	A	U	U	P	L	U	U	Q	Lxol		18	11		
Trichorzine	<i>Trichoderma virens</i>	Ac	U	G	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	L	U	U	Q	Lol	Vol	Wol	Fol	18	20
Trichostromacine	<i>Trichoderma stromaticum</i>	Ac	U	A	U	A	U	Q	U	Vx	U	Q	U	P	Lx	U	U	Q	Lxol				18	5	
Trichotoxine	<i>Trichoderma viride</i> <i>Trichoderma sp.</i>	Ac	U	G	U	L	U	Q	U	U	A	U	U	P	L	U	U	Q	Vol				18	14	
Trichovirine	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	G	A	L	U	Q	Vx	V	U	G	U	U	P	L	U	U	Q	Lol			18	12	
Boletusine	<i>Boletus sp.</i>	Ac	F	U	A	U	J	L	Q	G	U	U	A	A	U	P	U	U	U	Q	Wol		19	1	
Chrysospermine	<i>Apocrea chrysosperma</i>	Ac	F	U	S	U	L	Q	G	U	U	A	A	U	P	J	U	U	Q	Wol			19	4	
Peptaivirine	<i>Trichoderma sp.</i>	Ac	F	U	A	U	J	L	Q	G	U	U	A	A	U	P	J	U	U	Q	Fol	Wol		19	2
Trichokonine V	<i>Trichoderma koningii</i>	Ac	U	A	U	A	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol			19	1
Trichorzianine	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	A	A	U	U	Q	U	U	U	S	L	U	P	V	U	I	Q	Q	Fol	Wol		19	8
Trichostrigosine	<i>Trichoderma strigosum</i> <i>Trichoderma erinaceus</i>	Ac	U	A	U	A	Lx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Vx	U	Vx	Q	Q	Lxol			19	2
Trikoningine KA V	<i>Trichoderma koningii</i>	Ac	U	G	A	U	I	Q	U	U	U	S	L	U	P	V	U	I	Q	Q	Lol			19	1
Tricholongine	<i>Trichoderma strigosum</i> <i>Trichoderma pubescens</i> <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	G	F	U	U	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Vx	U	U	Q	Q	Lxol			19	6
Alaméthicine	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	Vx	U	G	L	U	P	Vx	U	U	Q	Q	Fol		20	26
Atroviridine	<i>Trichoderma atroviride</i>	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol		20	3
Glidodeliquesce A	<i>Gliocladium deliquescens</i>	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol		20	1
Hypelcine	<i>Hypocrea peltata</i>	Ac	U	P	U	A	U	Q	U	Lx	U	G	U	U	P	V	U	U	Q	Q	Lxol			20	15
Longibrachine	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	A	U	A	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol			20	6
Paracelsine	<i>Trichoderma saturnisporum</i> <i>Trichoderma reesei</i>	Ac	U	A	U	A	U	Q	U	V	U	G	U	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol			20	5
Polysporine	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	P	U	A	U	Q	U	V	U	G	V	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol			20	4
Saturnisporine SA I/II/III	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	L	U	G	U	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol		20	3
Stilboflavine	<i>Stibella flavipes</i>	Ac	U	P	U	A	U	Q	U	L	U	G	U	U	P	V	U	U	Q	Q	Lxol	Vxol		20	17
Suzukacilline	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	A	U	A	U	Q	U	Lx	U	G	Lx	U	P	Vx	U	Vx	U	Q	Q	Fol		20	15
Trichocelline	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	A	U	A	U	Q	U	Lx	U	G	U	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol			20	10
Trichokonine I/III/VI/VII/III/IX	<i>Trichoderma koningii</i>	Ac	U	A	U	A	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol			20	9
Trichosporine	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	G	A	U	Q	U	Lx	U	G	Lx	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol			20	19

Ac = acétyl, Fol = Phénylalaninol, Lol = Leucinol, Lx = Leucine/Isoleucine, Lxol = Leucinol/Isoleucinol, Vol = Valinol, Vx = Valine/Isovaline, Vxol = Valinol/Isovalinol, Wol = Tryptophanol.

b. L'alaméthicine

Les peptaïbols à longue séquence sont représentés par l'alaméthicine, premier peptaïbol isolé d'une culture de *Trichoderma viride* (souche NRRL 3199) par Meyer et Reusser en 1967 (Meyer et Reusser, 1967). La structure linéaire de ce peptide, initialement considérée comme cyclique (Payne *et al.*, 1970), a été révélée en 1976 par Martin et Williams (1976). La séparation par chromatographie sur couche mince de l'extrait préalablement décrit par Meyer et Reusser (antibiotique U-22324, Upjohn Company) a montré l'existence de deux types principaux d'alaméthicine dans le mélange (Melling et McMullen, 1975) : le type acide, nommé F30, lié à la présence d'un résidu Glu¹⁸, et le type neutre, F50, contenant un résidu Gln¹⁸. La dénomination F30 et F50 est due aux Rf de ces composés obtenus sur couche mince de silice.

Les premières structures définitives ont été reportées par Pandey *et al.* (1977a) pour les alaméthicines F30 I et F30 II. Les alaméthicines sont des peptides constitués de 20 acides aminés, présentant un groupement acétyl en extrémité N-terminale et un phénylalaninol en C-terminal.

Vingt-six séquences d'alaméthicine, toutes isolées d'une souche de *Trichoderma viride* (NRRL 3199), sont actuellement décrites (Tableau II.4). Leur masse moléculaire est comprise entre 1934 et 1990 Da. Les deux types d'alaméthicine F30 et F50 ont été isolés sous forme de mélanges microhétérogènes d'analogues, rendant compte de la complexité de leur séparation et de leur séquençage.

A l'aide de la CLHP couplée à la spectrométrie de masse à ionisation par électronébulisation, leur structure a récemment été reconsidérée par Kirschbaum *et al.* (2003). Dix analogues d'alaméthicine F30 ont été décrits par ces auteurs. Deux d'entre eux sont présents en majorité, l'analogue F30/3 et F30/7, et correspondent aux séquences précédemment décrites par Pandey *et al.* (1977a). Ces deux composés diffèrent par la présence en position 6 d'un résidu Ala pour l'analogue F30/3 et d'un Aib pour l'analogue F30/7. Pour le type neutre, treize séquences ont été reportées. L'analogue F50/5 et dans une moindre mesure l'analogue F50/7 représentent les peptides majoritaires du mélange d'alaméthicines F50. Ces deux composés diffèrent au niveau du résidu en position 6 de la même manière que celle observée pour les alaméthicines F30/3 et F30/7. Kirschbaum *et al.* (2003) ont également montré, au cours de cette étude, que les alaméthicines disponibles commercialement (produit N° 05125, Fluka et produit N° A4665, Sigma) correspondaient principalement à un mélange microhétérogène d'alaméthicines F50. Selon ces auteurs, la production prépondérante du type neutre ou acide par *T. viride* est liée aux conditions de fermentation utilisées pour la croissance du champignon. La fermentation en milieu riche conduit à la production quasi exclusive du type neutre, alors que la culture en milieu de malt favorise la biosynthèse des deux types de peptides en proportion équivalente.

En 2006, Psurek *et al.* ont reporté sept nouvelles séquences d'alaméthicine, isolées d'une souche de *Trichoderma viride* et caractérisées par électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse. Trois d'entre elles sont reportées dans le Tableau II.4, les quatre autres correspondent à des fragments d'alaméthicine tronquée soit par un acide pyroglutamique en N-terminal ou ne possédant pas l' amino alcool en C-terminal.

Tableau II.4 : Séquences des différents analogues de l'alaméthicine.

Les résidus conservés sont surlignés en gris.

Nom	Position																				M (Da)	Source bibliographique		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20				
F30/ [Aib ⁶ , Glu ¹⁹] [Aib ⁶ , Glu ⁷] [Glu ¹⁹]	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	E	Fol	1978	Psurek <i>et al.</i> (2006)	
	Ac	U	P	U	A	U	U	E	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol	1978		
	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	E	Fol	1964		
	1	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	U	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol		1949
	2	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	V	U	P	V	U	U	E	Q	Fol		1949
	3	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol		1963
	4	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	V	U	P	V	U	U	E	Q	Fol		1963
	5	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	V	E	Q	Fol		1977
	6	Ac	U	P	U	A	U	A	E	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol		1964
	7	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol		1977
	8	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	L	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol		1991
9	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	V	E	Q	Fol	1991		
10	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	A	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol	1991		
F50/ 2	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	A	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1934	Kirschbaum <i>et al.</i> (2003)	
	3a	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	U	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol		1948
	3b	Ac	U	P	U	A	A	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol		1948
	3c	Ac	U	P	U	A	U	G	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	V	Q	Q	Fol		1962
	4a	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	V	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol		1948
	4b	Ac	U	P	A	A	U	A	Q	U	U	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol		1934
	5	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol		1962
	6a	Ac	U	P	U	U	U	A	Q	U	Vx	U	G	L	U	P	Vx	U	U	Q	Q	Fol		1976
	6b	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	Vx	U	G	L	U	P	Vx	U	Vx	Q	Q	Fol		1976
	7	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol		1976
	8a	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	L	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol		1976
	8b	Ac	U	P	U	U	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol		1990
	8c	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	V	Q	Q	Fol		1990

Ac = acétyl, Fol = Phénylalaninol

II.2.1.2. Les peptaïbols à courte séquence

Les peptaïbols à courte séquence présentent une importante diversité de structure, incluant des masses moléculaires comprises entre 580 et 1860 Da (Rebuffat *et al.*, 1996). Ils sont principalement constitués de 11 à 16 résidus. Quelques molécules incluant 5 ou 17 résidus ont également été reportées, cependant elles représentent moins de 3% des séquences décrites jusqu'ici (Sharman *et al.*, 1996 ; Hülsman *et al.*, 1998 ; Schiell *et al.*, 2001) (Figure II.2).

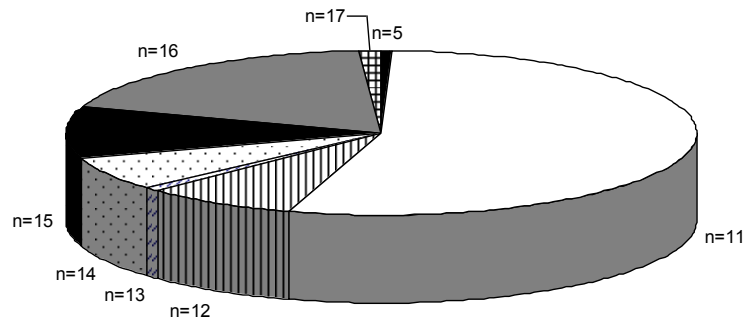


Figure II.2 : Pourcentage des différents peptaïbols à courte séquence en fonction du nombre de résidus (n) dans la séquence peptidique.

Les séquences peptidiques et les souches productrices des différents sous-groupes sont résumées dans le Tableau II.5. Les peptides incluant 11 à 14 résidus sont caractérisés par l'enchaînement successif de motifs Xaa-Yaa-Aib-Pro/Hyp (Rebuffat *et al.*, 1999). Leur extrémité C-terminale correspond en général à un valinol / isovalinol ou à un leucinol / isoleucinol. Deux d'entre eux, les trichobrevines A Ia et Ic, présentent des amino alcools peu fréquents, l'alaninol et l'acide α -aminoisobutanol (Degenkolb *et al.*, 2006b).

Les peptaïbols à 15 résidus présentent un Aib conservé en position 3. Excepté pour les ampullosporines et les tylopeptines, les positions 9, 10, 11 et 13 présentent des résidus hautement conservés, respectivement Aib, Pro/Hyp, Gln et Pro/Hyp. L'amino alcool correspond à un phénylalaninol ou à un leucinol. Les peptaïbols à 16 et 17 résidus présentent les mêmes acides aminés conservés en positions 9, 10, 11, et 13 que ceux précédemment décrits. Un motif Aib-Pro supplémentaire est conservé en position 14 et 15. L'amino alcool C-terminal est un phénylalaninol ou un serinol dans le cas des cephaïbols (Schiell *et al.*, 2001).

Tableau II.5 : Peptaïbols à courte séquence.

Les résidus Aib conservés sont surlignés en gris clair et les Pro/Hyp en gris foncé.

Sous-groupe	Souche productrice	Position																Nombre de résidus	Nombre de séquences		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16			17	
Peptaïboline	<i>Sepedonium sp.</i>	Ac	L	U	L	U	Fol												5	1	
Harzianine HB I/HK VI	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Ac	U	N	I	I	U	P	L	L	U	P	Lol						11	2	
	<i>Trichoderma harzianum</i>				L				J												
Hypomurocine A	<i>Hypocrea muroiana</i>	Ac	U	Q	I	Lx	U	P	L	Lx	U	P	Lol						11	6	
		J	V	V																	
Trichobrachine	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Lx	Lx	U	P	Lx	U	V	P	Vxol						11	35	
				Q	Vx	Vx				Vx	Lx	U		Lxol							
Trichobrevine	<i>Trichoderma brevicompactum</i>	Ac	U	A	Vx	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol						11	19	
				S	U	Lx	U						Vxol							Aol	Uol
Trichocryptine A	<i>Trichoderma brevicompactum</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol						11	12	
		Vx				Lx	Vx		U	Vx		Vxol									
Trichofumine A/B	<i>Trichoderma sp.</i>	Ac	V	Q	L	L	U	P	L	L	U	P	Lol						11	2	
					V																
Trichorovine	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	Q	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol						11	25	
				N	V	V						Vol									
Trichorozine	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	Q	I	L	U	P	I	L	U	P	Lol						11	4	
				N								Vol									
Cervinine	<i>Mycogone cervina</i>	Ac	L	U	P	U	L	U	P	A	U	P	V	Lol					12	1	
Trichocryptine B	<i>Trichoderma brevicompactum</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	U	P	U	Lx	U	P	Lxol						12	14	
		Vx				Vx	Vx			Lx	Vx	U	Vxol								
									Vx	U											
Trichofumine C/D	<i>Trichoderma sp.</i>	Ac	V	Q	L	U	Q	Q	L	L	P	L	U	P	Lol				13	2	
					V																
Bergofungine D	<i>Emericellopsis donezkii</i>	Ac	V	U	U	V	G	L	U	U	O	Q	U	O	U	Fol			14	1	
Harzianine HC/PC ₄	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	N	L	U	P	S	I	U	P	U	L	U	P	Lol			14	12	
				Q				A	V			J			Vol						
Ampullosporine	<i>Sepedonium ampullosporum</i>	Ac	W	A	U	U	L	U	Q	U	U	U	Q	L	U	Q	Lol		15	8	
									A	A	A				A						
Bergofungine A/B/C	<i>Emericellopsis donezkii</i>	Ac	V	U	U	U	V	G	L	U	U	O	Q	U	O	U	Fol		15	3	
									V			J									
Emerimicine III/IV	<i>Emericellopsis microspora</i>	Ac	F	U	U	U	V	G	L	U	U	O	Q	J	O	A	Fol		15	2	
															U						
Heptaïbine	<i>Emericellopsis sp.</i>	Ac	F	U	U	U	V	G	L	U	U	O	Q	U	O	U	Fol		15	1	
Samarosporine	<i>Emericellopsis microspora</i>	Ac	F	U	U	U	V	G	L	U	U	O	Q	J	O	U	Fol		15	2	
															A						
Stibelline	<i>Emericellopsis microspora</i>	Ac	F	U	U	U	V	G	L	U	U	O	Q	J	O	U	Fol		15	2	
															A						
Tylopeptine	<i>Tylopius neofelleus</i>	Ac	W	V	U	U	A	Q	A	U	S	U	A	L	U	Q	Lol		15	2	
					J																
Antiamoebine	<i>Stibella erythrocephal</i>	Ac	F	U	U	U	U	G	L	U	U	O	Q	J	O	U	P	Fol		16	16
	<i>Stibella fimetaria</i>		V	A	A	J	Vx	A		A					U	P					
	<i>Gliocladium catenulatum</i>				L																
Cephaïbol A,B,C,D,E	<i>Acremonium tubakii</i>	Ac	F	U	U	U	U	G	L	U	U	O	Q	J	O	U	P	Fol		16	6
						J	A		J					U							
Emerimicine II	<i>Emericellopsis microspora</i>	Ac	W	I	Q	J	I	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	Fol		16	2
						U															
Zervamicine	<i>Emericellopsis salmosynnemata</i>	Ac	W	I	Q	J	I	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	Fol		16	12
		L	V	E	U	V				V											
Cephaïbol P,Q	<i>Acremonium tubakii</i>	Ac	F	J	Q	U	I	T	U	L	U	P	Q	U	O	U	P	F	Sol	17	2
											O										

Ac = acétyl, Aol = Alaninol, Fol = Phénylalaninol, Lol = Leucinol, Lx = Leucine/Isoleucine, Lxol = Leucinol/Isoleucinol, Sol = Sérinol, Uol = Acide α -aminoisobutanol, Vol = Valinol, Vx = Valine/Isovaline, Vxol = Valinol/Isovalinol

II.2.2. Structure secondaire

La structure secondaire et les propriétés de conformation des peptaïbols ont été étudiées par différentes techniques analytiques (résonance magnétique nucléaire, dichroïsme circulaire, diffraction des rayons X) et par des méthodes de modélisation moléculaire (Rebuffat *et al.*, 1999). Les résultats de ces études structurales ont montré que les acides aminés α,α -dialkylés comme l'Aib, présents de façon importante dans les séquences des peptaïbols, réduisent considérablement les possibilités de conformation du squelette par rapport aux peptides ne contenant que des acides aminés α -monoalkylés (Burgess et Leach, 1973 ; Nagaoka *et al.*, 1995). Ainsi, les peptaïbols adoptent essentiellement une structure secondaire hélicoïdale de type hélice α , hélice 3_{10} ou un de ses dérivés, le ruban de coudes β (Karle et Balaram, 1990).

L'hélice α , structure la plus fréquente dans le repliement des peptides et protéines, est formée par la rotation régulière de la chaîne peptidique principale stabilisée par des liaisons hydrogène intramoléculaires entre l'atome d'oxygène du carbonyle d'un résidu i et le proton amide du résidu $i+4$ (Figure II.3). Un tour moyen d'hélice α contient 3,6 résidus. Les chaînes latérales sont situées vers l'extérieur de l'hélice. L'hélice 3_{10} est stabilisée par des liaisons hydrogène entre l'atome d'oxygène du carbonyle d'un résidu i et le proton amide du résidu $i+3$. Chaque tour d'hélice comporte 3,2 résidus. Le ruban de coudes β est une structure hélicoïdale dérivée de l'hélice 3_{10} , observée dans le cas des peptides constitués par l'alternance régulière du motif Aib-Pro ou Aib-Hyp (Di Blasio *et al.*, 1992 ; Ségalas *et al.*, 1999). Ce modèle structural est stabilisé par des liaisons hydrogène intramoléculaires identiques à celles observées pour l'hélice 3_{10} ($i \leftarrow i+3$) mais interrompues au niveau des résidus Pro/Hyp.

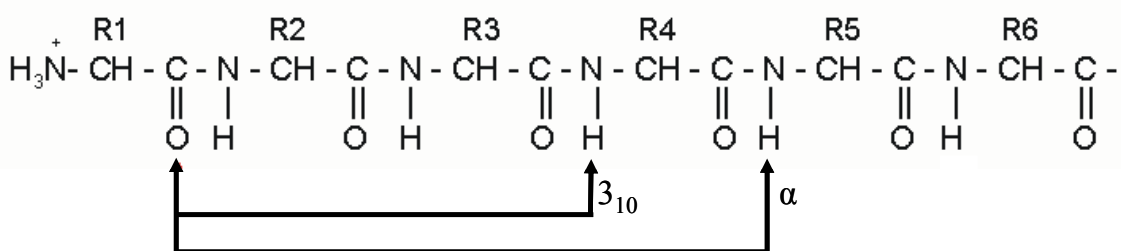


Figure II.3 : Schéma des liaisons hydrogène caractérisant les hélices α et 3_{10} .

Le type de structure adoptée par les peptaïbols est fonction de la taille du peptide, du nombre de résidus Aib et de leur localisation. De manière générale, les peptides incluant moins de 8 acides aminés se structurent préférentiellement en hélices 3_{10} , et les peptides constitués de 9 à 20 résidus en hélices α (Szekeres *et al.*, 2005).

Les alaméthines, peptaïbols à 20 résidus, présentent en solution, une structure secondaire très proche de leur structure cristalline, incluant les conformations en hélice α et en hélice 3_{10} (Fox et Richards, 1982 ; Esposito *et al.*, 1987). Avec une longueur de 34 Å, la molécule est structurée sous forme d'une hélice droite α , coudée de façon flexible au niveau du résidu Pro¹⁴, séparant ainsi la molécule en deux segments hélicoïdaux rigides (Figure II.4). La conformation en hélice 3_{10} est observée au niveau de l'extrémité N-terminale de la molécule (Yee *et al.*, 1995 ; Gibbs *et al.*, 1997). Les chaînes latérales des résidus Gln⁷, Glu/Gln¹⁸ et les groupements carbonyles des résidus centraux, particulièrement de la Gly¹¹, définissent un secteur hydrophile étroit, longitudinal et parallèle à l'axe principal. Cette disposition particulière est responsable du caractère amphipathique de la molécule, propriété importante dans la capacité d'interaction des peptaïbols avec les membranes cellulaires (Yee *et al.*, 1999 ; Duclouhier et Wroblewski, 2001).

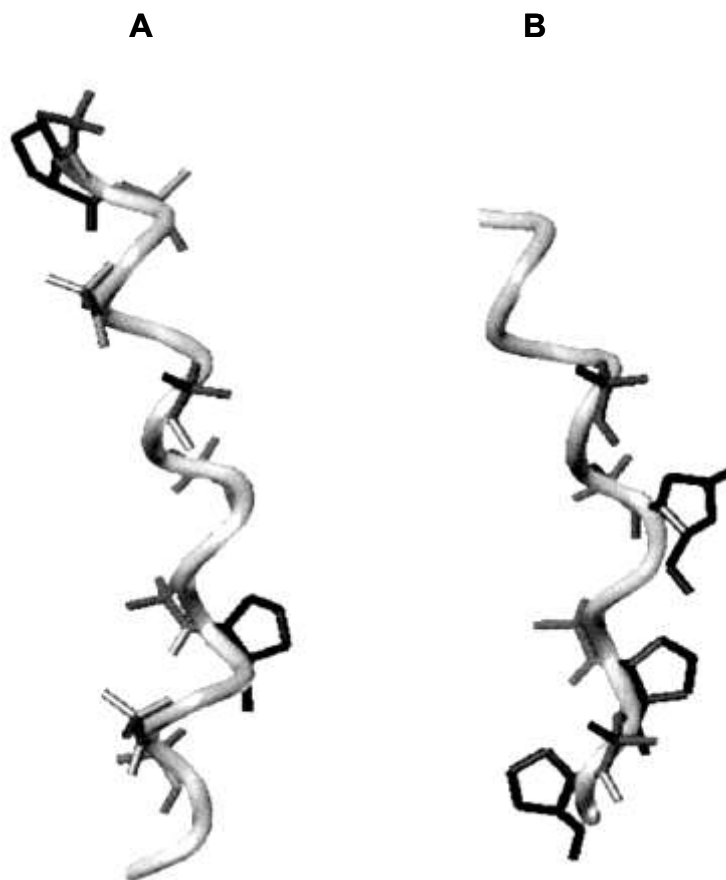


Figure II.4 : Comparaison des structures cristallines de l'alaméthicine F30 (A) et de l'antiamoebine (B). Les résidus Pro sont indiqués en noir et les résidus Aib en gris (d'après Biochemical Society Transactions).

Ce modèle conformationnel est observé pour les autres peptaïbols à longue séquence incluant 18 à 20 résidus tels que les saturnisporines (Rebuffat *et al.*, 1993), les longibrachines, les trichorzianines (Bodo *et al.*, 1985), les tricholongines (Rebuffat *et al.*, 1991) et les trichorzines (Hlimi *et al.*, 1995 ; Duval *et al.*, 1997). La flexibilité de la molécule, induite par le résidu Pro, contribue de

façon importante aux propriétés d'interaction de ces peptides avec les membranes biologiques (Yee *et al.*, 1999).

La conformation des peptaïbols à courte séquence inclut différents motifs hélicoïdaux. Leur principale caractéristique est la présence de la structure en ruban de coude β . Les antiamoebines, peptaïbols à 16 résidus, incluent par exemple une structure en hélice α de l'extrémité N-terminale au neuvième résidu (Figure II.4). Puis, la molécule est structurée en ruban de coudes β incluant les résidus Hyp¹⁰, Hyp¹³ et Pro¹⁵. Cette conformation, impliquant la localisation des chaînes latérales les plus hydrophobes sur une même face, est responsable du caractère amphipathique de la molécule (Rebuffat *et al.*, 1999).

II.3. Biosynthèse

II.3.1. Origine biologique

Les peptaïbols sont des métabolites exclusivement fongiques, produits par différents genres de champignons d'origine terrestre ou marine. La plupart de ces champignons sont des moisissures appartenant au sous-embranchement des Ascomycètes. Quelques séquences (la boletusine et les tylopeptines) ont été isolées de Basidiomycètes. Cependant, pour ces exceptions, différents auteurs remettent en cause l'origine de ces molécules et envisagent plutôt une biosynthèse par des Ascomycètes du genre *Sepedonium*, genre connu pour parasiter les Basidiomycètes (Degenkolb *et al.*, 2003).

Parmi les champignons impliqués dans la biosynthèse des peptaïbols, le genre *Trichoderma*, avec 75% des séquences décrites jusqu'ici, représente le principal producteur (Figure II.5).

Les *Trichoderma* sp. sont des champignons supérieurs anamorphes (forme asexuée), appartenant à la classe des Sordariomycètes, à l'ordre des Hypocréales et à la famille des *Hypocreaceae*. Leur forme téléomorphe (forme sexuée) est représentée par le genre *Hypocrea*, impliqué dans la biosynthèse de 7% des peptaïbols décrits. Dans l'environnement, les *Trichoderma* sp. sont des champignons ubiquistes (Samuels, 1996). La plupart sont saprotrophes, dégradant nombre de substrats. Ils sont ainsi très fréquemment rencontrés dans les sols ou sur les matières végétales en décomposition (Botton *et al.*, 1990). Ils représentent un intérêt industriel important pour leur production d'enzymes extracellulaires et sont également utilisés comme agent de lutte biologique contre les phytopathogènes fongiques. De nombreuses espèces de ce genre sont impliquées dans la

biosynthèse des peptaïbols, les plus fréquentes sont *T. viride*, *T. brevicompactum*, *T. longibrachiatum* et *T. harzianum*.

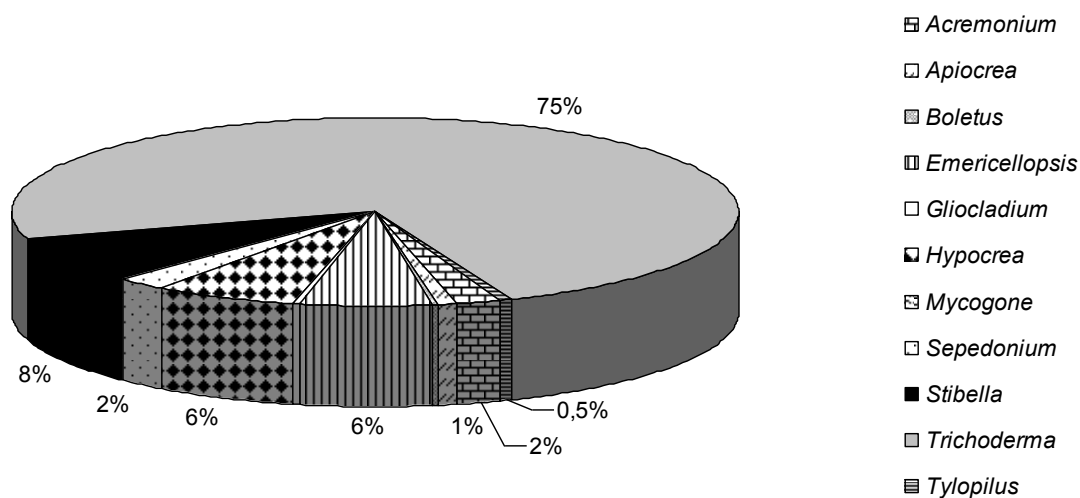


Figure II.5 : Importance des différents genres de champignons dans la biosynthèse des peptaïbols (en pourcentage de séquences décrites).

II.3.2. Voie de biosynthèse

Les peptaïbols et autres peptaïbiotiques sont biosynthétisés par voie non ribosomale impliquant des complexes multienzymatiques, les peptides synthétases ou NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetase) (Lipmann, 1973). Cette voie alternative de biosynthèse est à l'origine de la grande diversité des structures produites incluant une large gamme de résidus non protéinogènes. Les peptaïbols sont en conséquence produits sous forme de mélanges complexes d'analogues et de dérivés incluant généralement un ou plusieurs composés majoritaires (Brückner et Przybylski, 1984b ; Wiest *et al.*, 2002 ; Reiber *et al.*, 2003).

Les peptides synthétases, agencées sous forme de modules, sont de larges enzymes multifonctionnelles. Chaque module est responsable de l'incorporation d'un acide aminé spécifique dans la chaîne peptidique en formation. Les modules sont eux-mêmes subdivisés en plusieurs domaines, présentant chacun une fonction particulière dans l'incorporation du résidu. Il existe trois domaines principaux :

- le domaine d'adénylation (A) ; il permet la reconnaissance d'un acide aminé spécifique et son activation grâce à une réaction d'adénylation (l'acide aminé est transformé en aminoacyl adénylate) ;

- le domaine de thiolation (T ou PCP pour Peptidyl Carrier Protein) ; il fixe l'acide aminé sur la peptide synthétase de manière covalente par l'intermédiaire d'une liaison thioester ;
- le domaine de condensation (C) ; il permet la formation de la liaison peptidique entre deux résidus.

Il existe également des domaines secondaires spécialisés et des modules de polyketide synthase (PKS) en association avec les NRPS qui catalysent des modifications au niveau des acides aminés incorporés (épimérisation ou N-méthylation) ou au niveau du squelette peptidique (acylation, glycosylation ou hétérocyclisation) (Marahiel *et al.*, 1997). Un domaine particulier localisé en extrémité C-terminale de la peptide synthétase, tel que le domaine d'une thioestérase ou d'une réductase, permet de libérer le peptide néoformé. L'ordre et le nombre de ces domaines dans le complexe protéique définit la séquence et la structure du peptide produit (Kleinhauf et Dörhen, 1990 ; Von Döhren *et al.*, 1997). Les NRPS sont largement rencontrées dans la production de peptides antibiotiques ou de sidérophores chez les bactéries et champignons (Vizcaino *et al.*, 2005). Les peptides synthétisés par cette voie sont généralement courts (2 à 50 résidus). Ils présentent, du fait de leur originalité structurale, un intérêt pharmacologique important (antibiotiques, immunomodulateurs).

Quelques travaux récents ont permis la mise en évidence et la caractérisation des peptides synthétases impliquées dans la biosynthèse des peptaïbols au sein de plusieurs souches de champignons. Wiest *et al.* (2002) ont cloné et séquencé, pour la première fois, un gène (*tex1*) codant une peptaïbol synthétase (*Tex1*) chez une souche de *Trichoderma virens* produisant un mélange complexe de peptaïbols à 11, 14 et 18 résidus. Avec une taille de 62,8 kb, le gène *tex1* encode une synthétase de plus de 2,3 MDa et représente le plus large gène de NRPS connu. La peptaïbol synthétase *Tex1* est constituée de 18 modules (Figure II.6). L'extrémité N-terminale comporte un module correspondant à une PKS, constitué de deux domaines incluant une ketoacyl synthase et une acyl transférase, permettant l'acylation du résidu N-terminal. L'extrémité C-terminale présente un domaine similaire à une 3 β -hydroxystéroïde déhydrogénase, catalysant la réduction de l'acide aminé C-terminal en amino alcool. Des expériences de mutation du gène *tex1* ont montré qu'aucun peptaïbol n'était produit par les souches de *T. virens* mutées. Selon les auteurs, *Tex1* serait donc responsable de la biosynthèse de l'ensemble des peptaïbols à 11, 14 et 18 résidus produits par *T. virens*.

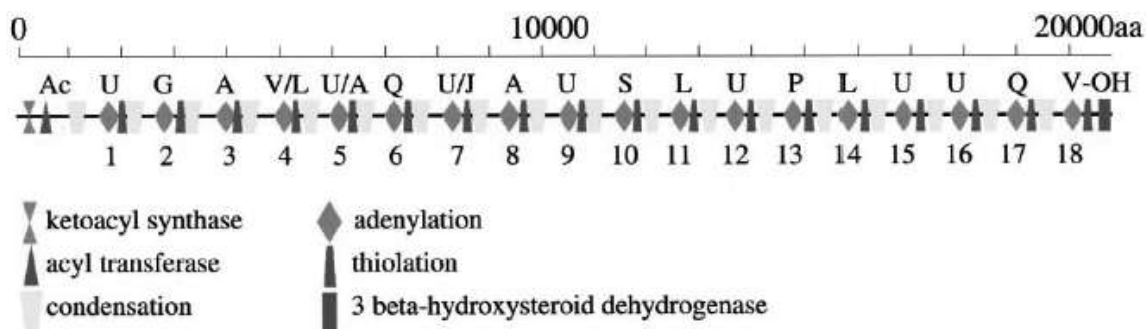


Figure II.6 : Structure modulaire de la peptide synthétase *Tex1* (d'après Wiest *et al.*, 2002). Les modules de *Tex1* (1 à 18) et les différents domaines constitutifs de chaque module sont indiqués. Le résidu incorporé par chaque module est également représenté. L'échelle définit la position des acides aminés constitutifs de *Tex1*.

En 2003, Reiber *et al.* ont caractérisé deux protéines isolées en étroite relation et impliquées dans la biosynthèse des ampullosporines, peptaïbols à 15 résidus produits par *Sepedonium ampullosporum*. L'une d'elle, de 350 kDa, comporte le module PKS responsable de l'acylation du résidu N-terminal puis deux modules impliqués dans l'incorporation respective des résidus Trp et Ala (Figure II.7). Treize autres modules sont localisés sur la seconde protéine, de 1,5 MDa, qui inclut également une réductase C-terminale catalysant la réduction du résidu C-terminal et la libération du peptaïbol formé. L'ensemble constitue la synthétase catalysant la biosynthèse de l'ampullosporine A et de ses analogues, certains modules pouvant présenter quelques variabilités de spécificité vis-à-vis de l'acide aminé à incorporer. Ce manque de spécificité de certains modules, conduisant à une importante diversité d'analogues, a également été observé par Raap *et al.* (2005) lors de l'étude des zervamicines, peptaïbols à 15 résidus, produits par une souche d'*Emericellopsis salmosynnemata*. Ainsi, les mélanges microhétérogènes de peptaïbols incluent généralement des peptides présentant des masses moléculaires très proches. Des différences d'1 Da, de 14 Da ou bien même la présence d'isomères peuvent être observées, correspondant à des échanges Gly/Ala, Ala/Aib, Aib/Iva, Asn/Gln, Val/Iva, Leu/Ile, Gln/Glu entre les séquences peptidiques.

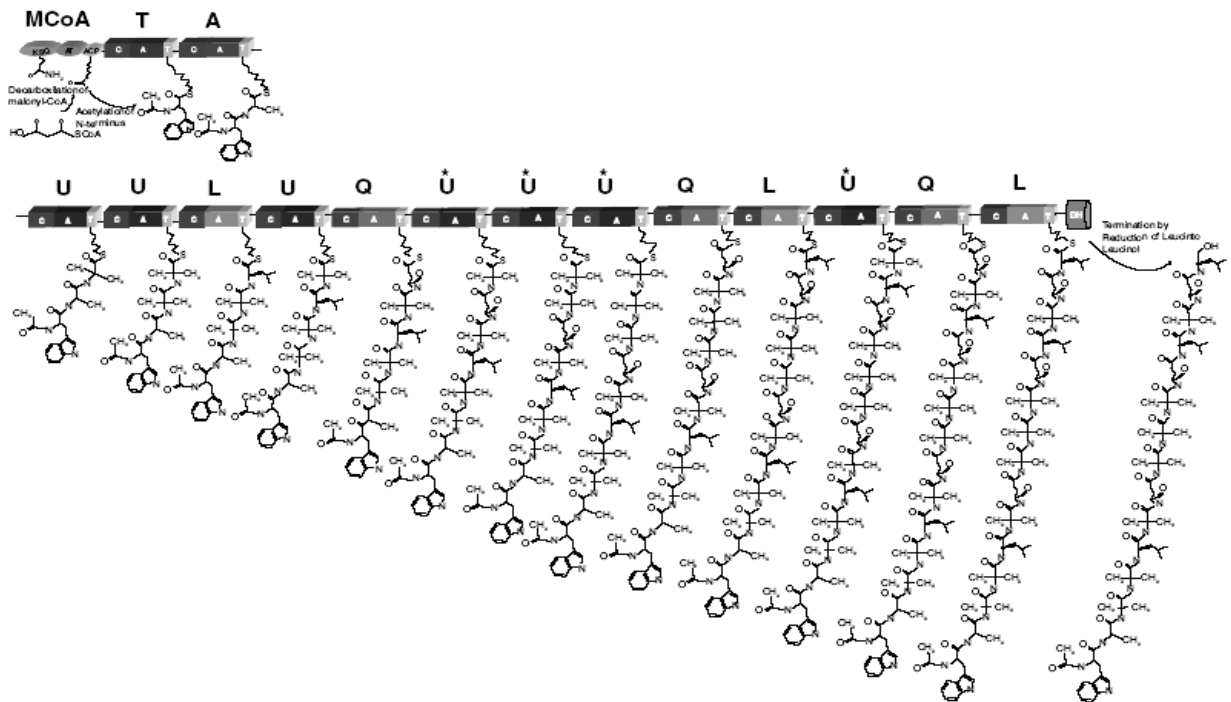


Figure II.7 : Biosynthèse de l'ampullosporine A par une peptide synthétase (modèle proposé par Reiber et al., 2003). Les acides aminés incorporés sont représentés au dessus de chaque module constitutif de la NRPS. MCoA = malonyl-CoA.

Selon Reiber *et al.* (2003), les peptaïbols incluant moins ou plus de 15 résidus ne peuvent pas être biosynthétisés par la synthétase de l'ampullosporine et de ses analogues. Au sein d'une même souche, il doit donc exister différentes NRPS, chacune biosynthétisant une certaine catégorie de peptaïbols incluant un nombre spécifique de résidus, conclusion réfutant celle précédemment émise par Wiest *et al.* concernant *Tex1* (2002).

Récemment, les travaux de Wei *et al.* (2005) ont montré que la synthétase homologue à *Tex1* isolée d'une souche de *Trichoderma virens* était seulement responsable de la production des peptaïbols à 18 résidus et non des 11 et 14 résidus, confirmant ainsi l'hypothèse de Reiber. Les résultats de cette étude signalent, de plus, l'existence d'une importante diversité de gènes codant des NRPS chez *T.virens*.

II.4. Propriétés membranaires et biologiques des peptaïbols

II.4.1. Interaction des peptaïbols avec les membranes cellulaires

La conformation hélicoïdale des peptaïbols définit l'existence d'un moment dipolaire selon l'axe de l'hélice, contribuant à l'insertion de ces molécules dans les membranes cellulaires (Chugh et Wallace, 2001 ; Hara *et al.*, 2001). Le pôle positif est représenté par l'extrémité N-terminale principalement hydrophobe, et le pôle négatif par la partie C-terminale, riche en résidus hydrophiles. Cette interaction avec les bicouches lipidiques membranaires conduit à la formation de structure de type pores ou canaux ioniques voltage-dépendants transmembranaires, s'accompagnant d'une fuite extracellulaire d'ions et de métabolites et d'une dépolarisation de la membrane. Cette perméabilisation membranaire peut aboutir, à terme, à la mort cellulaire (Sansom, 1993 ; Cafiso, 1994 ; Chugh et Wallace, 2001).

En raison de l'activité antimicrobienne résultante de ces interactions, les propriétés membranaires des peptaïbols, et particulièrement celles de l'alaméthicine, représentent un intérêt considérable dans la recherche de nouveaux antibiotiques et ont par conséquent été abondamment étudiées depuis les années 1970 (Gordon et Haydon, 1972 ; Boheim *et al.*, 1978 ; Bessler *et al.*, 1979 ; Bonnafous *et al.*, 1979 ; Archer et Cafiso, 1991 ; Sansom, 1993 ; Tieleman *et al.*, 2001 ; Vitkova *et al.*, 2006).

II.4.1.1. Formation des canaux transmembranaires

Les études réalisées sur les interactions peptaïbols / membranes, la structure et les propriétés électriques des canaux transmembranaires, ont permis de proposer différents modèles pour expliquer la formation et l'activation de ces canaux. Les travaux les plus récents s'accordent à décrire un modèle de formation en deux étapes (Huang, 2000 ; Vitkova *et al.*, 2006 ; Oliynyk *et al.*, 2007). A un faible ratio peptide/lipide, le peptide s'adsorbe parallèlement à la surface de la membrane (Figure II.8, A). Lorsque le ratio peptide/lipide augmente, les monomères peptidiques changent de conformation et insèrent leurs domaines hydrophobes (extrémités N-terminales) dans la membrane en repoussant les têtes hydrophiles des phospholipides (Figure II.8 B) (He *et al.*, 1996a). Au dessus d'une certaine concentration en peptides, les monomères s'internalisent et se regroupent dans la membrane en créant des pores (Figure II.8 C-E). Les études réalisées sur les membranes artificielles ont mis en évidence l'importance du voltage transmembranaire dans l'initiation de cette étape d'insertion du peptaïbol dans la membrane (Archer et Cafiso, 1991 ; Duclohier et Wroblewski, 2001 ; Tieleman *et al.*,

2001 ; Mottamal et Lazaridis, 2006). Cette sensibilité au voltage est cependant variable en fonction du peptaïbol mis en jeu (Duclohier *et al.*, 2004).

Différents modèles sont proposés pour expliquer l'architecture des canaux ainsi formés. Le modèle dit en douves de tonneaux (barrel-stave), indépendamment décrit par Boheim (1974) et Baumann et Mueller (1974), est largement admis pour expliquer la structure des canaux formés par l'alaméthicine et ses analogues à longue séquence (Figure II.8 C). Ces canaux sont constitués d'une agrégation de plusieurs monomères peptidiques (6 à 10 en général) orientés comme les planches d'un tonneau et liés entre eux par l'interaction de certains acides aminés. La face externe du canal est représentée par les domaines hydrophobes des hélices en contact avec les chaînes hydrocarbonées des lipides membranaires, et la face interne par les domaines hydrophiles (Chen *et al.*, 2002). Dans le cas de l'alaméthicine, les chaînes latérales des résidus Gln⁷, Glu/Gln¹⁸ et Gln¹⁹, et les groupements carbonyles des résidus Aib¹⁰ et Gly¹¹ constituent la face interne du canal. L'ensemble est stabilisé par des interactions peptide-eau et peptide-lipide (Sansom, 1993 ; Epanand *et al.*, 1995).

La structure des canaux transmembranaires formés par les peptaïbols à courte séquence est moins bien connue et différents modèles sont proposés pour expliquer l'interaction de ces peptides avec la membrane (Rebuffat *et al.*, 1996 ; Wada *et al.*, 1996 ; Augeven-Bour *et al.*, 1997 ; Duclohier *et al.*, 1998). Le modèle dit en tapis (carpet-like mechanism), souvent décrit comme un mécanisme de type détergent, repose sur l'accumulation d'un très grand nombre de peptides à la surface membranaire (Figure II.8 D-E). Cette accumulation superficielle induit des désordres et des limitations de fluidité dans la membrane qui finissent par entraîner sa rupture (Chugh et Wallace, 2001). Un troisième modèle impliquant une dimérisation des molécules au sein de la membrane a également été proposé, notamment pour expliquer l'activité de la trichorovine XII, peptaïbol à 11 résidus (Wada *et al.*, 1996). Au dessus d'une certaine concentration en peptides, les monomères internalisés s'assemblent deux à deux au niveau de leurs extrémités N-terminales de manière à former un dimère transmembranaire. L'agrégation de plusieurs dimères permettrait la formation du canal.

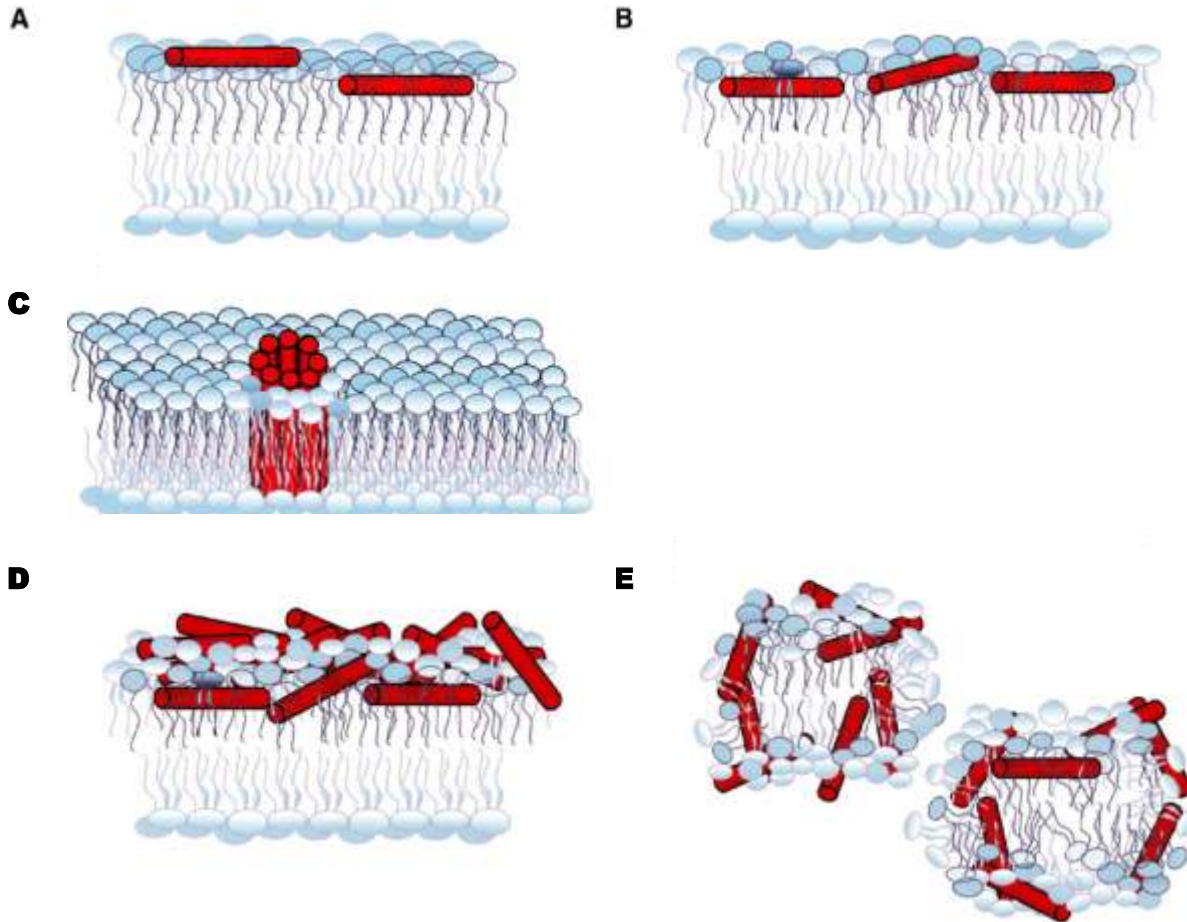


Figure II.8: Interaction des peptaïbols avec les membranes biologiques et formation des canaux transmembranaires, d'après Sato et Feix (2006) : (A) Les peptides sous forme d'hélices (cylindres rouges) s'associent initialement parallèlement à la surface de la membrane, soit superficiellement ou incorporés juste en dessous des têtes polaires des phospholipides. (B) Les molécules peptidiques s'accumulent à la surface ou près de la bicouche phospholipidique, perturbant l'assemblage des lipides et diminuant ainsi l'épaisseur de la membrane. Cette étape peut entraîner des agrégations peptide-peptide. (C) À partir d'un seuil critique du ratio peptide/lipide, les molécules s'insèrent dans la membrane sous la forme d'un pore selon le modèle en douves de tonneaux. (D) L'accumulation continue de peptides couvre la membrane selon le modèle en tapis, entraînant des désordres (E) qui finissent par provoquer la rupture membranaire.

II.4.1.2. Caractéristiques des canaux transmembranaires

Les caractéristiques structurales et fonctionnelles des canaux transmembranaires formés par les peptaïbols varient principalement en fonction de la séquence du peptide étudié et de la composition en lipides, de la température et du degré d'hydratation de la membrane (Heller *et al.*, 1997 ; Lucaciu *et al.*, 1997 ; Bak *et al.*, 2001 ; Duclouhier, 2004 ; Marsh *et al.*, 2007).

Les canaux formés par l'alaméthicine présentent un diamètre de 18 à 26 Å et peuvent être composés de 6 à 12 monomères (He *et al.*, 1996b). Selon Fox et Richards (1982), la forme octamérique semblerait être la plus stable. L'observation des fluctuations du courant enregistré au

niveau d'un canal révèle différents niveaux de conductance, augmentant avec la concentration en peptide (Molle *et al.*, 1987). Ces variations, caractéristiques du modèle en douves de tonneaux, sont expliquées par l'agrandissement du diamètre des canaux par adjonction de monomères.

Les canaux formés par la trichotoxine A-50E, peptaïbol à 18 résidus, semble suivre un modèle hexamérique. La trichotoxine A-50E est un des seuls peptaïbols présentant une conformation entièrement en hélice α (Chugh *et al.*, 2002). Un coude léger est induit par la proline, cependant la molécule est presque droite. Cette conformation permet la formation d'un canal uniformément parallèle, présentant un seul niveau de conductance et par conséquent un diamètre fixe du canal (Duclohier *et al.*, 2004). Cette caractéristique est également observée dans le cas des canaux formés par certains peptaïbols à courte séquence, tels que les harzianines HC, peptaïbols à 14 résidus (Lucaciu *et al.*, 1997) et l'antiamoebine I, peptaïbol à 16 résidus (O'Reilly et Wallace, 2003).

Un modèle de canal octamérique a été réalisé à partir de la structure cristalline de la forme monomérique de l'antiamoebine I. Le canal présente une forme en entonnoir, induite par le coude significatif causé par la présence de plusieurs imino-acides dans la séquence peptidique des monomères. Des liaisons hydrogène entre les hélices orientent les chaînes latérales des résidus Gln¹¹ de manière à former une constriction dans la lumière du canal. Cette contracture formée par les chaînes latérales des Gln a été proposé pour d'autres modèles de canaux formés par les peptaïbols, et notamment pour ceux formés par l'alaméthicine (Fox et Richards, 1982). Cette caractéristique permet de stabiliser l'agrégat hélicoïdal et produit un environnement polarisable au centre du pore, qui pourrait permettre le passage d'ions hydratés ou partiellement hydratés. Un diamètre minimal de 9 Å est observé au niveau de cette constriction, puis la lumière du canal augmente jusqu'à 20 Å au niveau des extrémités N-terminales (Figure II.9). Les résidus aromatiques Phe et phénylalaninol situés au deux extrémités de la séquence peptidique de l'antiamoebine (cf. Tableau II.5) permettent de stabiliser la position transmembranaire des monomères par interaction avec les têtes hydrophiles et les chaînes hydrophobes des phospholipides.

Le nombre de monomères constitutifs du canal conducteur, et donc les variations de diamètre associées, sont à l'origine des variations de conductance mais aussi de sélectivité ionique des canaux. De manière générale, la sélectivité ionique est faible ; cependant, le passage des cations (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+}) semble être facilité dans un bon nombre de cas (Fonteriz *et al.*, 1991 ; Sansom, 1993 ; Tachikawa *et al.*, 1996). Les canaux formés par la trichotoxine A-50E présentent un transport élevé de cations par rapport aux canaux formés par l'alaméthicine. Cette spécificité serait liée en partie aux différences de potentiel électrostatique de surface induit par le moment dipolaire des molécules (Duclohier *et al.*, 2004). Le modèle de canal proposé pour l'antiamoebine I suggère un potentiel de surface négatif à l'intérieur du canal, en adéquation avec un transport facilité de cations (O'Reilly et Wallace, 2003).

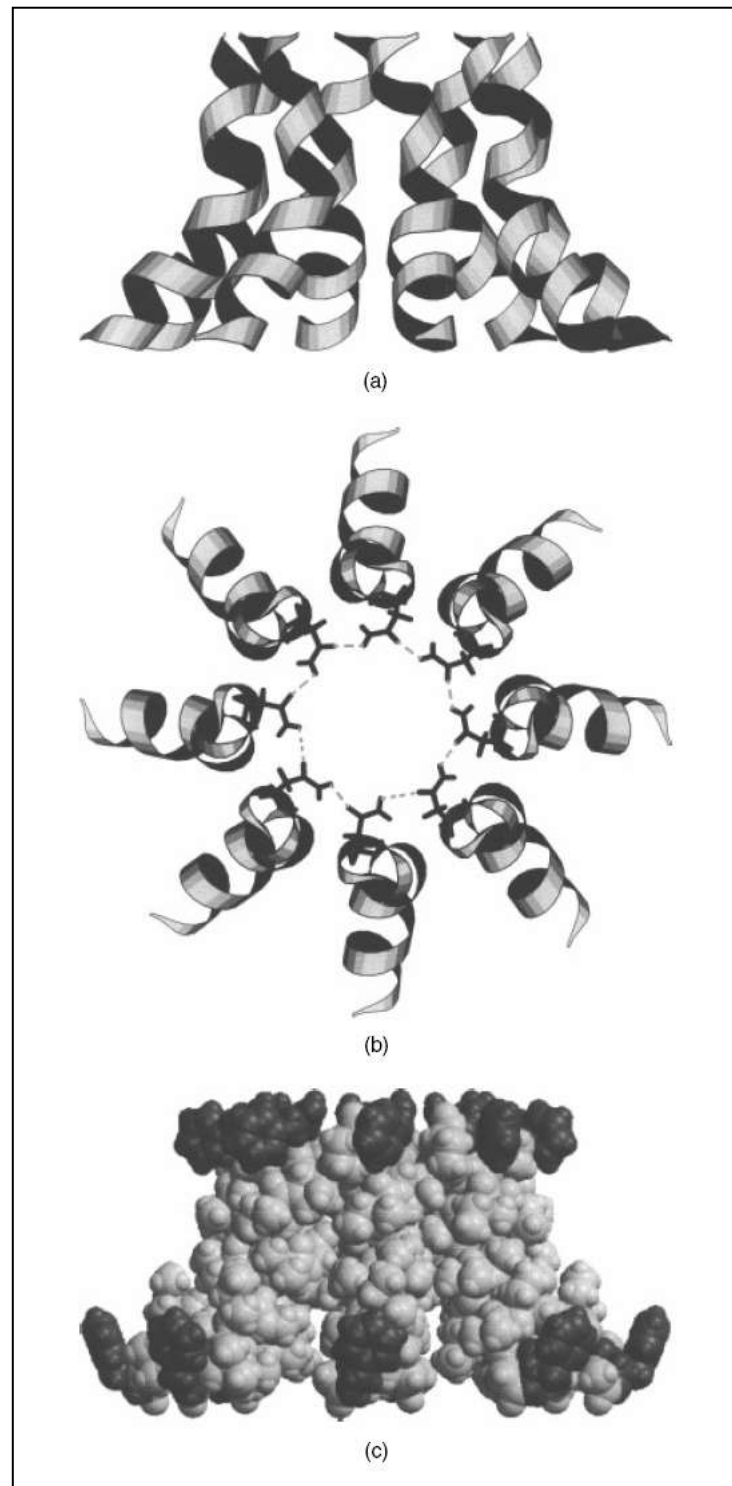


Figure II.9 : Modèle du canal formé par l'antiamoebine I, d'après O'Reilly et Wallace (2003). (a) Canal octamérique, vue de profil ; (b) vue de haut, les chaînes latérales des résidus Gln sont représentées par des bâtons pleins et les liaisons hydrogènes par les pointillés ; (c) modèle dans l'espace (vue de profil) montrant la localisation des résidus aromatiques (en noir).

II.4.1.3. Relations structures/activités

La formation de canaux transmembranaires par les peptaïbols dépend de nombreux facteurs liés aux caractéristiques structurales des molécules. De manière générale, les peptides présentant une conformation hélicoïdale et une amphipathie marquées, une forte affinité pour les lipides membranaires et une capacité importante d'agrégation dans les membranes sont plus favorables à la formation de ces canaux (Hara *et al.*, 2001 ; Kropacheva *et al.*, 2005).

La comparaison des activités de différents peptaïbols a permis de mettre en évidence l'importance de certaines caractéristiques dans cette efficacité d'interaction.

Le nombre de résidus dans la séquence peptidique joue ainsi un rôle important. Une plus grande efficacité de perméabilisation membranaire a en effet été démontrée pour les peptaïbols à longue séquence (18 à 20 résidus) par rapport aux peptaïbols à courte séquence (11 et 14 résidus) (Rebuffat *et al.*, 1999 ; Grigoriev *et al.*, 2003). Les concentrations nécessaires à l'activité membranaire des harzianines HC à 14 résidus sont par exemple dix fois plus élevées (10^{-8} à 5.10^{-8} M) que celles nécessaires à l'activité de leurs homologues à 18 résidus (10^{-9} à 5.10^{-9} M) (Rebuffat *et al.*, 1999).

La perméabilisation membranaire est également fortement gouvernée par la nature des résidus constitutifs de la séquence.

Ainsi, la présence de résidus hydrophobes favorise fortement l'activité membranaire, ce phénomène est d'autant plus marqué que le peptide est court (Rebuffat *et al.*, 1996 ; Rebuffat *et al.*, 2000).

La proline localisée en position 13 ou 14 dans les peptaïbols à longue séquence est un acide aminé essentiel à l'interaction du peptide avec les différents systèmes membranaires (Dathe *et al.*, 1998). Bien que diverses études aient montré que ce résidu n'était pas indispensable à la formation des canaux (Duclohier *et al.*, 1992 ; Nagaoka *et al.*, 1995), leur probabilité de formation, les niveaux de conductance et leur stabilité sont fortement diminués pour les composés n'incluant pas de Pro ou à une position autre que celles normalement observées (Nagaoka *et al.*, 1995 ; Kaduk *et al.*, 1997).

La présence d'un tryptophanol en C-terminal, en comparaison au phénylalaninol, favorise la stabilisation des agrégats conducteurs formés par les trichorzines, probablement en raison de la formation de liaisons hydrogène entre le groupe indole du tryptophanol et les groupements polaires des lipides membranaires (Duval *et al.*, 1998).

Selon Cosette *et al.* (1999), la présence d'une charge négative liée au résidu Glu¹⁸ diminue considérablement l'activité membranaire des longibrachines LGB II en comparaison aux LGA I contenant un résidu Gln¹⁸. Une répulsion plus importante des monomères au sein de l'agrégat est en effet observée, diminuant ainsi sa stabilité. Une observation similaire a été reportée par El Hajji *et al.* (1989) lors de l'étude de l'activité membranaire des trichorzianines A et B.

II.4.2. Activités biologiques

Les peptaïbols présentent un large spectre d'activités biologiques, considérées, pour la plupart, comme le résultat de leurs propriétés membranaires (Rebuffat *et al.*, 1999 ; Chugh et Wallace, 2001). Une fois encore, l'alaméthicine constitue le peptaïbol le plus utilisé dans la réalisation de ces tests biologiques. De nombreuses variations d'activité existent cependant entre les différents composés ; les principaux critères structuraux régissant les interactions membranaires (nombre de résidus et hydrophobie) semblent être impliqués dans ces variations d'activité biologique.

Les activités biologiques principales des peptaïbols seront présentées dans les pages suivantes.

II.4.2.1. Activité antibactérienne

Les propriétés antibactériennes des peptaïbols ont été principalement démontrées sur les bactéries à Gram positif et dans une moindre mesure sur les bactéries à Gram négatif (Rebuffat *et al.*, 1999 ; Szekeres *et al.*, 2005 ; Xiao-Yan *et al.*, 2006).

De nombreux tests ont également été conduits sur différents genres de mollicutes, bactéries parasites dépourvues de paroi pour lesquelles très peu d'antibiotiques efficaces sont connus (Rebuffat *et al.*, 1995 ; Beven et Wroblewski, 1997 ; Duval *et al.*, 1997 ; Leclerc *et al.*, 2001). Ces tests, réalisés dans des conditions de manipulation identiques, ont permis une comparaison entre les différents peptaïbols testés. Une activité similaire a ainsi été observée pour les longibrachines LGA IV, LGB II et LGB III, la trichorzine PA VI et l'alaméthicine F50, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises dans une même gamme de valeurs (0,56 à 12,5 μM) (Leclerc *et al.*, 2001). L'activité bactéricide observée est essentiellement due à la perméabilisation de la membrane plasmique. En comparaison, l'activité des molécules à courte séquence (harzianines HK VI et HC IX) est un peu plus faible (CMI = 12,5 à 50 μM) (Rebuffat *et al.*, 2000).

Cependant, ces bioessais *in vitro* ne reflètent pas systématiquement la toxicité *in vivo* des composés. Nir-Paz *et al.* (2002) ont ainsi montré, à l'aide de cellules cancéreuses humaines (HeLa) infectées par des *Mycoplasma* sp., que la présence de sérum dans le milieu de culture diminue l'activité antimycoplasmique de l'alaméthicine. Néanmoins, son activité est fortement potentialisée en présence d'enrofloxacin, antibiotique utilisé dans le domaine vétérinaire.

II.4.2.2. Activité antivirale

L'activité antivirale des peptaïbols a été reportée pour la première fois par Yun *et al.* (2000). Dans une perspective de recherche d'agents antiviraux permettant de lutter contre le virus de la mosaïque du tabac, ces auteurs isolèrent les peptaïvirines A et B, présentant une activité antivirale élevée pour des concentrations de l'ordre de 10 µg.mL⁻¹.

II.4.2.3. Activité antiprotozoaire

L'activité antiprotozoaire des peptaïbols a été reportée pour la première fois pour l'antiamœbine, peptaïbol à 16 résidus isolé d'une souche d'*Emericellopsis poonensis* (Thirumalachar, 1968).

Cette activité a également été mise en évidence pour des peptaïbols à longue séquence, les trichorzianines A et B (El Hajji *et al.*, 1989). Ces composés inhibent la croissance de l'amibe *Dictyostelium discoideum*. La modification de perméabilité membranaire par les peptaïbols aboutit à la lyse des cellules. La trichorzianine B, incluant un Glu¹⁸, présente une activité quatre fois plus faible que celle obtenue pour son homologue, incluant une Gln¹⁸.

II.4.2.4. Activité antifongique

L'action inhibitrice des peptaïbols a été mise en évidence sur la croissance de nombreuses espèces fongiques et de levures (Szekeres *et al.*, 2005). Grigoriev *et al.* (2003) ont ainsi montré que l'activité biologique de quatorze peptaïbiotiques naturels sur la souche fongique *Phoma destructiva* était positivement corrélée aux capacités membranaires de ces peptides. Les molécules à longue séquence, dont l'activité membranaire est élevée, entraînent une inhibition de la croissance du champignon, alors que les molécules à courte séquence induisent seulement la formation de pigments.

D'autre part, une synergie d'action a été démontrée entre les enzymes hydrolytiques et les trichorzianines, synthétisées en parallèle par une souche de *Trichoderma harzianum* utilisée comme agent de lutte biologique (Schirmbock *et al.*, 1994). Cette interaction pourrait avoir un rôle important dans le mécanisme d'action antagoniste de ce micromycète à l'encontre des champignons phytopathogènes (Lorito *et al.*, 1996).

II.4.2.5. Interaction avec les cellules ou les organismes animaux

a. Activités cellulaires

Au niveau cellulaire, de nombreuses activités biologiques ont été observées :

- stimulation de la sécrétion de catécholamines par les cellules chromaffines (Artalejo *et al.*, 1990 ; Tachikawa *et al.*, 1991 ; Wada *et al.*, 1997 ; Dathe *et al.*, 1998 ; Kitagawa *et al.*, 1998),
- découplage de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries (Takaishi *et al.*, 1980 ; Das *et al.*, 1986 ; Okuda *et al.*, 1994),
- stimulation des enzymes membranaires telles que l'adénylate et la guanylate cyclases (Szekeres *et al.*, 2005)
- activité hémolytique sur des érythrocytes humains (Brückner *et al.*, 1984 ; Dathe *et al.*, 1998),
- inhibition de la mobilité des spermatozoïdes de porc (Peltola *et al.*, 2004),
- activité cytotoxique sur différentes lignées cellulaires (Hou *et al.*, 1972 ; Bessler *et al.*, 1979 ; Iida *et al.*, 1999 ; Oh *et al.*, 2002 ; Peltola *et al.*, 2004).

b. Toxicité larvaire

La toxicité larvaire des peptaïbols a été mise en évidence sur différents modèles biologiques.

L'utilisation croissante de souches de *Trichoderma* sp. comme agent de lutte biologique contre les pathogènes des plantes a amené différents auteurs à étudier les risques sanitaires liés à la présence de leurs métabolites dans les produits de récolte et l'environnement terrestre. Favilla *et al.* (2006) ont ainsi étudié la toxicité de trois peptaïbols de la famille des alaméthines, des paracelsines et des antiameobines sur deux modèles invertébrés *Artemia salina* et *Daphnia magna*. Des DL₅₀ (dose entraînant la mort de 50% des individus) dans la gamme du micromolaire sont obtenues pour l'ensemble des composés testés après 24 h d'exposition. Dans chaque cas, l'alaméthine est apparue comme le composé le plus actif.

Matha *et al.* (1992) ont étudié la toxicité de différents peptaïbols et d'un peptaïbiotique pour les larves de moustiques *Culex pipiens*. Une activité insecticide marquée est observée pour l'ensemble des peptaïbols testés avec des DL₅₀ comprise entre 56 et 119 µM ; une activité environ huit cent fois plus élevée est obtenue avec l'efrapeptine F, peptaïbiotique à 17 résidus. Dans tous les cas, les mitochondries sont la cible intracellulaire privilégiée et leur destruction représente l'action principale des toxines.

Dans un dernier temps, une activité élevée des peptaïbols à longue séquence, isolés de souches de *Trichoderma* sp. d'origine marine, a été mise en évidence à plusieurs reprises à l'aide d'un test biologique sur larves de diptères (*Phormia terrae novae*) (Landreau *et al.*, 2002 ; Reculeau, 2003). Ce test, initialement mis au point pour évaluer la neurotoxicité du venin de scorpions, a été adapté à l'étude des mycotoxines marines et permet la détection des neurotoxines (Denardou, 1998). Les peptaïbols entraînent une contraction et une immobilisation immédiate et irréversible des larves, traduisant leur action neurotoxique. Les peptaïbols à 20 résidus isolés d'une souche de *T. longibrachiatum* d'origine marine, présentent une neurotoxicité quinze à trente fois plus élevée lorsqu'ils sont testés en mélange par rapport à celle observée pour les composés purs (Ruiz, 2007). Les peptaïbols à 11 résidus, isolés de cette même souche, se sont avérés inactifs sur ce test.

c. Toxicité sur mammifères

La toxicité sur mammifères a été étudiée à l'aide de tests biologiques réalisés sur souris adulte. Une seule étude au cours de laquelle les peptaïbols ont été administrés aux animaux par voie orale est disponible, les autres ayant toutes été conduites par voie intrapéritonéale. Cette étude concerne la trichotoxine A, peptaïbol à 18 résidus. Par voie orale, la toxicité est faible ; les souris, nourries à une concentration de 600 mg.kg⁻¹, sont maintenues quatre mois sans symptômes apparents. Cette inactivité pourrait être liée à une détoxification dans le tractus digestif ou au fait que la toxine ne puisse pas passer la paroi intestinale. Injectée par voie intrapéritonéale, les mêmes composés entraînent la léthargie des individus et leur mort dans une période de 1 h à 3 j en fonction de la dose injectée (Hou *et al.*, 1972). Une DL₅₀ de 4,36 mg.kg⁻¹ a été obtenue.

L'activité neuroleptique des peptaïbols a été étudiée par Berg *et al.* (2003) et Grigoriev *et al.* (2003). Cette activité, se traduisant par l'hypothermie et une perturbation de l'activité locomotrice des animaux, est observée pour tous les peptaïbols testés à une concentration de 10 mg.kg⁻¹. A 20 mg.kg⁻¹, les peptaïbols à longue séquence (alaméthicine F30, chrysospermine C, paracelsine A) induisent la mort des individus dans un laps de temps très court après injection (temps non communiqué).

Cette activité neuroleptique a été également démontrée pour des peptaïbols purs à 20 et 11 résidus, isolés d'une souche de *T. longibrachiatum* d'origine marine (Ruiz, 2007). Pour les composés à longue séquence, la mort des individus est observée 30 min à 2 h après injection d'une concentration de 20 mg.kg⁻¹ et après 24 h pour une injection de 10 mg.kg⁻¹.

Récemment, Ovchinnikova *et al.* (2007) ont mis en évidence l'activité neuroleptique des zervamicins IIA et IIB, peptaïbols à 16 résidus. Des perturbations comportementales sont observées pour des concentrations variant de 0,05 à 12,0 mg.kg⁻¹ en fonction du composé étudié.

II.5. Méthodologies d'analyse des peptaïbols

II.5.1. Production et isolement

L'étude des peptaïbols produits par les diverses espèces de micromycètes est réalisée à partir de cultures *in vitro* conduites sur des milieux synthétiques solides ou liquides. Les milieux utilisés sont nombreux et influencent la nature et la quantité des peptaïbols biosynthétisés (Kirschbaum *et al.*, 2003 ; Reiber *et al.*, 2003). Ces milieux peuvent être adaptés à un groupe d'espèces à écologie particulière et sont par exemple réalisés à base d'eau de mer dans le cas des moisissures d'origine marine.

La présence de peptaïbols associés au mycélium varie en fonction de la souche étudiée. Dans la plupart des cas, ils sont essentiellement excrétés dans le milieu de fermentation (Rebuffat *et al.*, 1999). L'isolement des peptaïbols biosynthétisés est effectué par une extraction de la biomasse fongique et/ou du milieu de fermentation à l'aide de solvants organiques. En raison du caractère amphiphile de ces peptides, l'extraction est généralement réalisée à l'aide de solvants ou mélanges de solvants moyennement polaires (*n*-butanol, mélange méthanol/dichlorométhane).

Les peptaïbols extraits sont ensuite purifiés et séparés en différents groupes par des techniques diverses telles que l'extraction en « phase solide » (SPE ; silice greffée C18 ou diol), la chromatographie d'exclusion (sephadex LH-20), la chromatographie sur phase stationnaire polaire (silice, silice greffée diol). Chaque groupe consiste généralement en un mélange microhétérogène d'analogues, qui peuvent être en partie séparés par CLHP sur phase inverse (C8, C18 ; détection UV 220 ou 280 nm). Cependant, l'obtention de peptaïbols purs et homogènes à partir de tels mélanges représente la principale difficulté dans l'étude de ces peptides.

Au niveau de ces étapes d'isolement, la mise en évidence des analytes peut être réalisée par chromatographie planaire impliquant un réactif spécifique des liaisons peptidiques, le 4,4 tétraméthyl-diamino-diphényl méthane (TDM) (Brückner et Przybylski, 1984a). L'orcinol, révélateur spécifique des molécules glycoconjuguées, peut également être utilisé. Il colore la plaque en jaune et permet la révélation indirecte des peptaïbols sous forme de spots restés blanchâtres (Ruiz, 2007). Ces méthodes permettent une mise en évidence simple et rapide de peptaïbols dans une fraction. Cependant, la révélation est non spécifique et nécessite des quantités importantes d'analytes.

II.5.2. Identification et analyse séquentielle

II.5.2.1. Méthodes utilisées

Compte tenu des caractéristiques structurales particulières des peptaïbols (blocage des extrémités N- et C-terminales, présence de résidus hydrophobes), les méthodes biochimiques classiquement utilisées pour l'analyse séquentielle des peptides et protéines (séquençage du génome, méthode d'Edman) sont inappropriées pour la détermination de leur séquence. Au cours des trois dernières décennies, le développement des techniques de spectrométrie de masse (SM) autorisant l'analyse des molécules et de macromolécules non volatiles ont permis de nombreux progrès dans l'analyse séquentielle de ces composés. Ainsi, les méthodes d'ionisation les plus souvent rencontrées dans la littérature pour l'étude des peptaïbols, sont le bombardement par atomes ou ions rapides (FAB) (Brückner et Przybylski, 1984a ; Auvin-Guette *et al.*, 1992 ; Rebuffat *et al.*, 1996), l'électronébulisation (electrospray, ES) (Iida *et al.*, 1995 ; Jaworski et Brückner, 1999 ; Psurek *et al.*, 2005 ; Sabareesh et Balaram, 2006) et la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) (Peltola *et al.*, 2004 ; Vizcaino *et al.*, 2005).

Dans le cas des techniques entraînant une ionisation à haute énergie (FAB), les spectres obtenus permettent l'observation d'ions pseudomoléculaires protonés $[M+H]^+$ ou adduits cationiques $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, accompagnés d'un nombre remarquable d'ions fragments non spécifiques (Iida *et al.*, 1994). Dans le cas des mélanges microhétérogènes de peptaïbols, la présence de ces fragments complique singulièrement l'interprétation et la détermination des séquences (Degenkolb *et al.*, 2003).

L'utilisation de techniques plus récentes (ES, MALDI), impliquant une ionisation douce, a alors supplanté l'analyse par SM-FAB. Elles conduisent à la formation d'ions pseudomoléculaires stables $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+nH]^{n+}$ et $[M+nNa]^{n+}$, permettant de déterminer facilement la masse moléculaire des composés. L'accès à la séquence d'acides aminés est réalisé par la fragmentation en tandem SM/SM et SM^n des ions pseudomoléculaires et de leurs fragments successifs. Ces fragmentations sont obtenues par les méthodes de dissociation induite par collision (CID) où l'ion d'intérêt est sélectionné et entre en collision avec les atomes d'un gaz non chargé (argon ou hélium). L'isolement de cet ion doit être réalisé sur une fenêtre de masse la plus faible possible afin de caractériser sans ambiguïté les ions fragments obtenus.

Récemment, en analogie au protéome et au peptidome, Krause *et al.* (2006a) ont introduit le terme de peptaïbiome pour définir l'ensemble des peptides synthétisés par un organisme fongique et caractérisés par la présence de l'acide aminé non protéinogénique Aib. Le terme peptaïbiomique, caractérisant les méthodologies analytiques utilisées pour la détermination structurale de ce peptaïbiome, a également été défini en conséquence. Dans ce sens, les auteurs proposent une méthode de criblage rapide et spécifique du peptaïbiome applicable aux micromycètes filamenteux cultivés sur une seule boîte de Petri. Cette méthode inclut une purification des peptaïbiotiques extraits à l'aide d'une extraction en phase solide (cartouche SPE C18), suivie d'une analyse par CLHP en

phase inverse (C18) couplée à un spectromètre de masse à électronébulisation et trappe d'ions. Les séquences partielles des peptaïbiotiques sont déduites des ions fragments et comparées avec la base de données compilant les structures des composés connus.

La détermination des acides aminés isomériques Leu/Ile peut être réalisée à l'aide de la spectrométrie de masse en tandem (FAB) (Landreau, 2001) ou par l'étude de la fragmentation des adduits lithium $[M+Li]^+$ (Hlimi, 1997). Cependant, aucune de ces méthodes ne permet la caractérisation des acides aminés isomériques Val/Iva. La détermination complète de la séquence nécessite alors des analyses supplémentaires impliquant l'analyse par CLHP (détecteur spectrophotométrique ou SM) ou par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (détecteur à ionisation de flamme ou SM) des acides aminés obtenus après hydrolyse acide des peptaïbols. La comparaison des temps de rétention (t_R) obtenus avec ceux d'acides aminés de référence permet aussi d'obtenir la chiralité de ces acides aminés. Enfin, la résonance magnétique nucléaire (RMN) peut être utilisée pour une résolution efficace et complète des séquences, elle permet également de fournir les bases pour une analyse conformationnelle complémentaire (Hlimi *et al.*, 1995 ; Rebuffat *et al.*, 1999).

II.5.2.2. Étude séquentielle des peptaïbols par SM

En mode de détection des ions positifs, la fragmentation SM/SM et SM^n des ions pseudomoléculaires générés par les peptaïbols conduit à la formation de fragments spécifiques, nommés selon la nomenclature définie par Roepstorff et Fohlman (Roepstorff et Fohlman, 1984) puis complétée par Biemann (Biemann, 1988). Ces fragments résultent du clivage d'une liaison de la chaîne peptidique. Ce clivage peut avoir lieu au niveau de trois types de liaisons C α -C, C-N ou N-C α pour donner six types de fragments désignés respectivement a_n , b_n , c_n , si la charge positive est retenue par le côté N-terminal et respectivement x_n , y_n , z_n si la charge positive est retenue par le côté C-terminal ; n désignant le nombre d'acides aminés contenus dans le fragment (Figure II.10). La différence de masse entre deux ions consécutifs d'une même série permet de déterminer l'identité de l'acide aminé et donc de déduire la séquence du peptaïbol (à l'exception des isomères L/I, Lol/Iol, V/J, Vol/Jol).

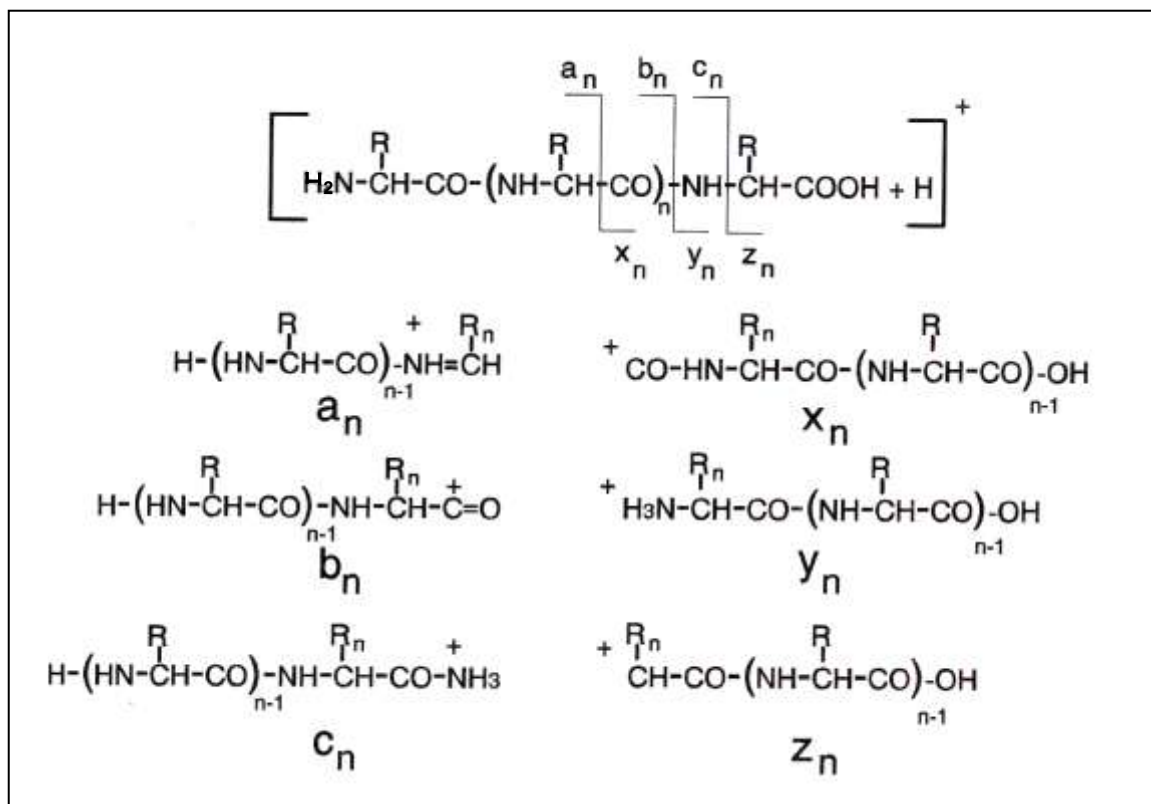


Figure II.10 : Voies de fragmentations principales des peptides par spectrométrie de masse SM^n (d'après De Hoffmann et Stroobant, 2005).

Les liaisons Aib-Pro ou Aib-Hyp, fréquemment rencontrées dans les peptaïbols, présentent une fragmentation privilégiée. Le groupe imino de la proline (ou de l'hydroxyproline), inclus dans un cycle à cinq atomes, présente en effet une affinité protonique plus importante que les autres liaisons amides du peptide. Dès lors, la protonation et le clivage de la liaison amide de la proline est un processus favorisé et de plus accentué par l'encombrement stérique du carbone α, α -dialkylé de l'Aib (Rebuffat *et al.*, 1995 ; Leclerc *et al.*, 1998b). Le schéma de fragmentation de cette liaison, en milieu acide, est illustré dans la Figure II.11. Deux voies sont en compétition : la première conduit à la formation d'un ion acylium \mathbf{b}_n N-terminal et d'une amine primaire, la seconde à un ion ammonium \mathbf{y}_n C-terminal et d'un cétène.

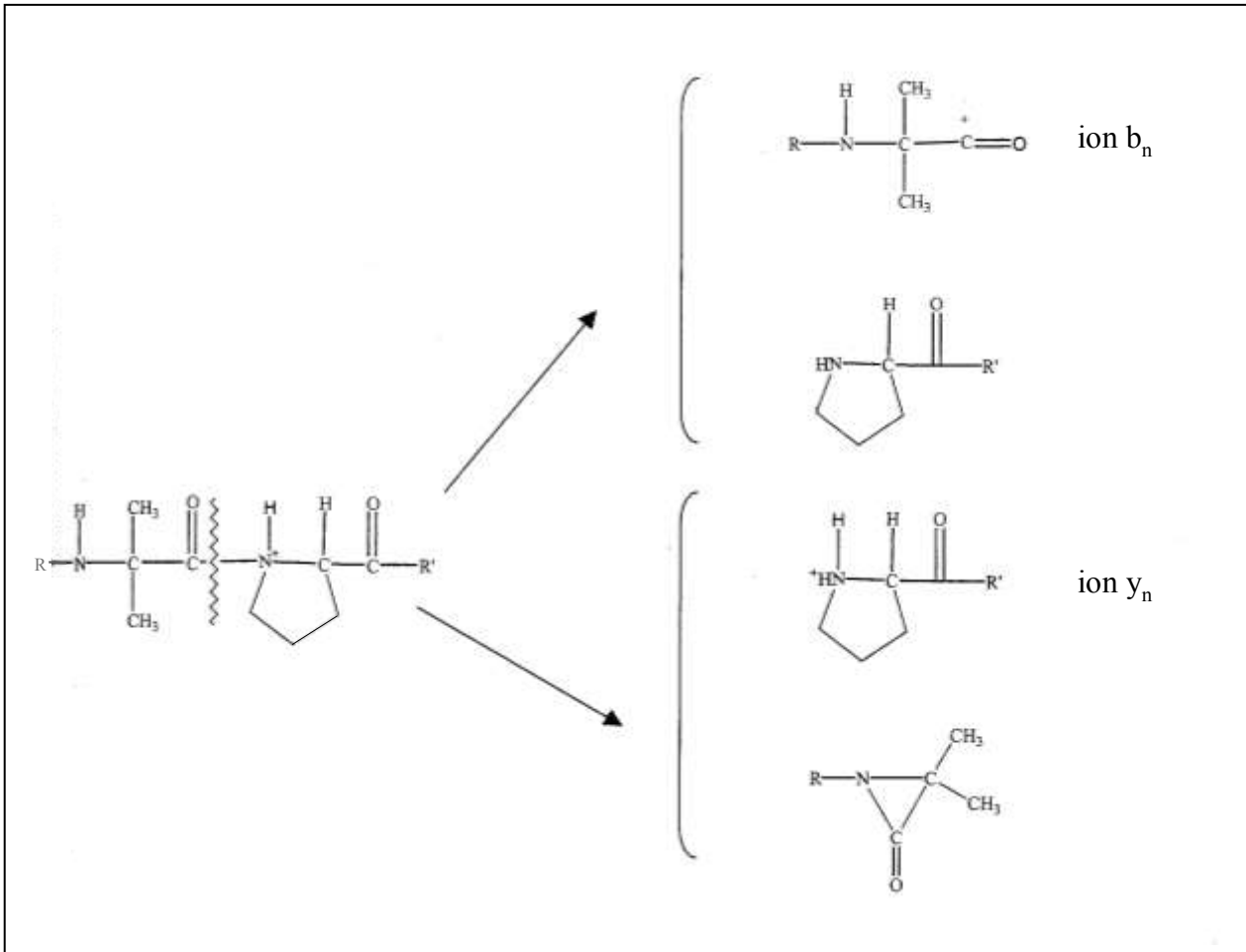


Figure II.11 : Fragments résultant du clivage préférentiel de la liaison Aib-Pro (d'après Hlimi, 1997).

En milieu acide, l'analyse de peptaïbols, sans fragmentation induite, conduit alors à l'observation d'ions pseudomoléculaires $[M+H]^+$ et $[M+2H]^{2+}$ accompagnés de ces ions N- et C-terminaux, généralement majoritaires. Après fragmentation à basse énergie (trappe d'ions) de l'ion $[M+H]^+$, les ions N- et C-terminaux précédents sont observés généralement associés à d'autres ions des mêmes séries b_n et y_n résultant de fragmentations additionnelles à d'autres endroits de la chaîne principale (Kirschbaum *et al.*, 2003 ; Krause *et al.*, 2006a ; Psurek *et al.*, 2006). Ces ions peuvent être ensuite successivement fragmentés (SM^n) de manière à obtenir l'ensemble de la séquence. Les ions acyliums b_n sont obtenus par clivage direct d'une liaison amide de la chaîne principale. La formation des ions y_n nécessite un transfert de deux hydrogènes supplémentaires, l'hydrogène responsable de la protonation et un second provenant de l'autre partie du peptide. La formation de ces deux séries d'ions permet une complémentarité et un recoupement des informations obtenues. Lorsque plusieurs liaisons Aib-Pro ou Aib-Hyp sont présentes dans le peptide, le spectre devient plus complexe, en raison de la superposition d'un grand nombre de séries d'ions fragments.

En milieu neutre et en absence de cations ajoutés, les ions pseudomoléculaires $[M+Na]^+$ et $[M+2Na]^{2+}$ sont majoritairement formés. Leur fragmentation conduit principalement à la formation d'adduits sodium type immonium a_n et ammonium y_n . Le clivage préférentiel des liaisons Aib-Pro ou Aib-Hyp résulte dans la formation d'un ion sodium a_n N-terminal et d'un ion sodium y_n C-terminal. Les ions sodium acylium b_n et des fragments supplémentaires résultant de clivages au niveau des chaînes latérales des acides aminés peuvent également être observés mais en plus faible abondance. Conventionnellement, les ions a_n sont générés par la perte d'un groupement CO à partir des ions précurseurs b_n . Cependant, selon Sabareesh *et al.* (2006), la faible abondance ou l'absence des ions sodium b_n observée suite à la fragmentation des ions $[M+Na]^+$ pourrait suggérer une génération directe des ions sodium de type a_n .

La nomenclature de la fragmentation des peptides ayant été définie sur la base des peptides protonés, nous utiliserons, dans la suite du manuscrit, la notation $[a_n+Na]^+$, $[y_n+Na]^+$ et $[b_n+Na]^+$ pour définir respectivement les adduits sodium a_n , y_n , et b_n formés en milieu neutre afin de les différencier des ions positifs protonés ou non protonés a_n , y_n , b_n formés en milieu acide.

Chapitre III

***Détection et identification des peptaïbols
dans l'environnement marin***

Chapitre III : DETECTION ET IDENTIFICATION DES PEPTAÏBOLS DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN

III.1. Contexte de l'étude

Les moisissures filamenteuses isolées du milieu marin et déjà connues en milieu terrestre sont capables de se développer, au laboratoire, en conditions de culture marine et de produire de nombreux métabolites représentant un intérêt pharmacologique majeur. Cependant, leur isolement, généralement réalisé à partir des spores contenues dans les échantillons prélevés, ne démontre pas leur développement dans cet environnement. Ainsi, leur considération comme espèces marines reste encore très discutée.

Pourtant, la diversité et la répartition des moisissures filamenteuses dans les écosystèmes pélagiques et benthiques ont été étudiées à travers différents travaux, réalisés dans de nombreuses régions littorales du monde. Les populations fongiques des zones côtières hawaïennes ont ainsi été étudiées par Wright Steele (1967), définissant des variations d'abondance et de diversité en fonction des zones étudiées. La zone supralittorale, très stable, présentait le nombre le plus élevé d'isolats. Une faible abondance était observée dans la zone infralittorale, pouvant être expliquée, selon les auteurs, par le balayage des marées. En 1993, Shaumann s'est intéressé à la microfonge présente en Mer du Nord et en Atlantique Nord. Les souches ont été isolées à partir d'échantillons de sédiments et d'eau de mer prélevés en haute mer, à différentes profondeurs allant de la zone sublittorale à la zone abyssale. Une nette prédominance du genre *Penicillium* a été observée, suivie d'*Ulocladium*, *Scopulariopsis*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Fusarium* et *Acremonium*. La comparaison des échantillons en fonction de la zone de prélèvements a montré que l'abondance et la diversité des souches fongiques étaient influencées par certains paramètres physico-chimiques du milieu tels que la profondeur, la nature du sol, la concentration en oxygène et les échanges d'eau. Une faible densité fongique a ainsi été observée dans les zones à forts remous et courants où l'accumulation de matières organiques est limitée. A l'inverse, les zones protégées ont présenté une densité plus importante.

La diversité de la microfonge d'une plage de Rio de Janeiro a été étudiée par De Moura Sarquis et De Oliveira (1996) révélant la présence de 170 espèces de champignons filamenteux dominés par les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Trichoderma*. Selon ces auteurs, les sédiments côtiers représentent ainsi un vaste réservoir fongique. Le rôle des moisissures y est peu connu, mais leur présence pourrait avoir une importance non négligeable pour la faune et la flore de cet écosystème. Gonzalez *et al.* (1998) a étudié la diversité de la microfonge des plages mexicaines. L'espèce marine facultative *Cladosporium cladosporioides* et l'espèce marine obligatoire *Corollospora maritima* étaient les plus abondantes sur les trois sites de prélèvement. Les différences de distribution des espèces entre les différents sites ont suggéré une variation des communautés, pouvant être liée

aux caractéristiques biotiques et abiotiques spécifiques à chaque site. En général, l'abondance et la composition des espèces marines et non marines étaient similaires à celles observées au niveau de plages de région plus tempérée (Rees et Jones, 1985). L'abondance des moisissures non marines identifiées dans ce travail pourrait indiquer un rôle important de ces champignons dans les processus de minéralisation et de recyclage des nutriments. Sous l'influence de facteurs écologiques, ces espèces peuvent se développer dans les écosystèmes marins et alors être considérées comme des espèces marines facultatives.

Plus récemment, les recherches effectuées par Khudyakova *et al.* (2000) au niveau des plages japonaises ont montré l'abondance des genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Trichoderma*. Selon ces auteurs, l'abondance et la diversité des souches fongiques seraient plus élevées dans les sédiments fortement impactés par les apports anthropogéniques, avec une dominance de souches au fort pouvoir toxigène, représentées par les genres *Chaetomium*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Trichoderma*. La microfonge des eaux côtières du nord de la Grèce montre également une prédominance des genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Alternaria* (Arvanitidou *et al.*, 2002).

L'étude de la microfonge isolées de zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire a montré une dominance des genres *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium* et *Aspergillus* (Sallenave, 1999). Dans ces zones d'élevage, la production de fecès et de pseudo-fecès par les huîtres et moules cultivées favorisent fortement la sédimentation et l'augmentation du taux de matière organique des sédiments (Sornin *et al.*, 1983). Ces zones pourraient donc constituer un substrat de choix pour le développement des champignons saprotrophes. La présence de pieux en bois utilisés dans les bouchots d'élevage pourrait également favoriser la croissance des souches lignicoles (Sallenave, 1999).

Ces différentes études illustrent bien le fait que les écosystèmes marins pélagiques et benthiques constituent un réservoir important de moisissures filamenteuses. La comparaison des différents résultats montre des similitudes de répartition, les champignons du genre *Penicillium*, *Aspergillus* et *Trichoderma* étant largement représentés dans les différents lieux et prélèvements. Même si le rôle de ces micromycètes et les facteurs écologiques contrôlant leur distribution dans ces environnements restent mal connus, les zones fermées ou semi fermées, présentant une forte teneur en matière organique, semblent être nettement propice à leur développement.

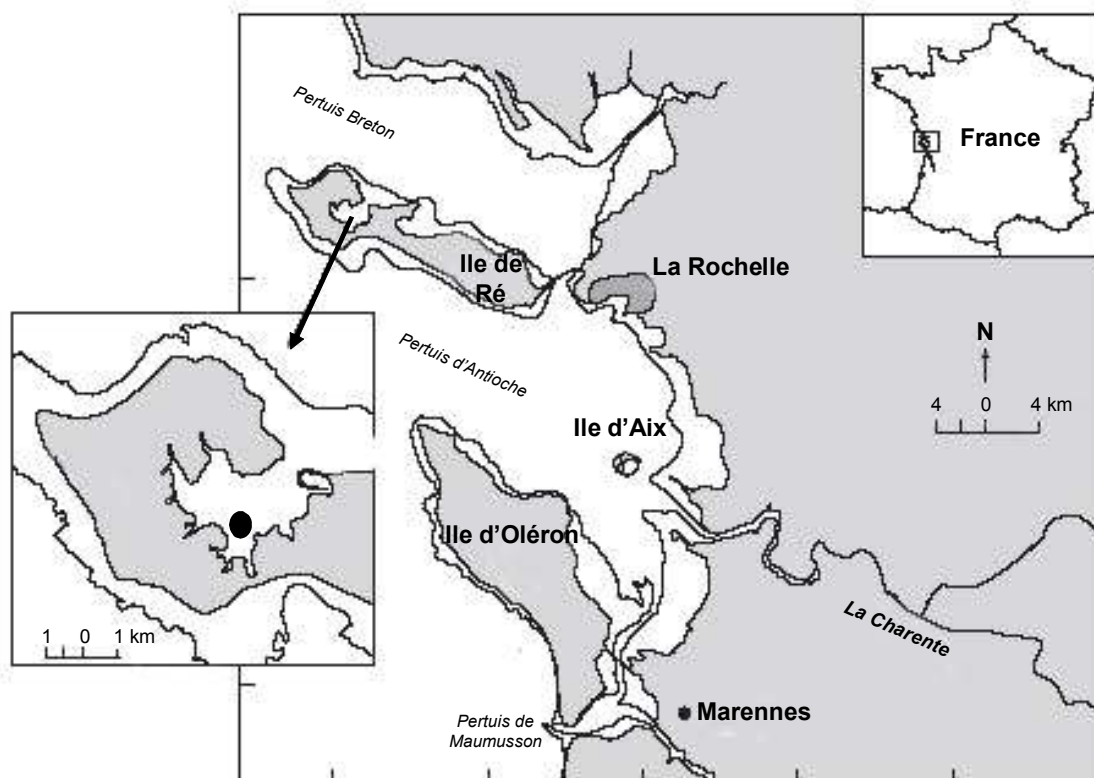
Dans notre étude, la détection de peptaïbols dans des échantillons prélevés en zones conchylicoles et l'isolement des souches productrices ont constitué les premières étapes dans l'étude des risques toxiques liés à la présence potentielle de ces métabolites en milieu marin. La détection de tels métabolites, spécifiquement produits par des moisissures saprotrophes dans des sédiments, ou bioaccumulés par des organismes, permettrait, de plus, de confirmer et de caractériser plus précisément le développement de cette microfonge dans l'environnement marin.

III.2. Recherche des peptaïbols dans les échantillons du Fier d'Ars

La recherche des peptaïbols a été initiée dans des échantillons de sédiments et de moules prélevés sur le site du Fier d'Ars en raison d'une toxicité élevée et inexplicée des élutriats sédimentaires pour les embryons de *Mytilus edulis* (Amiard-Triquet *et al.*, 2003).

III.2.1. Localisation géographique et caractéristiques du site de prélèvement

Le Fier d'Ars est une baie macrotidale fermée, formant un vaste ensemble littoral localisé dans le golfe de Gascogne au Nord-Ouest de l'île de Ré (Figure III.1). Le Fier d'Ars associe, d'une part, des grandes vasières et bancs de sable découverts à marée basse et, d'autre part, un ensemble de marais endigués. Les étendues de vase regorgent d'herbiers jouant un rôle déterminant dans la richesse biologique du site. Les activités humaines y sont principalement tournées vers la saliculture, l'ostréiculture et la pisciculture. Le Fier d'Ars renferme également des gisements naturels de moules propices à la pêche à pied. Dans le cadre de notre étude, les prélèvements des échantillons ont été



effectués au niveau des parcs à huîtres localisés sur la vasière sud de la baie.

Figure III.1 : Localisation du Fier d'Ars. Carte d'après Bel Hassen (2001).

Les prélèvements des échantillons ont été réalisés dans le sud de la baie (symbolisé par le rond noir dans l'encadré).

La qualité des sédiments du Fier d'Ars a été évaluée lors d'une étude réalisée par Amiard-Triquet *et al.* (2003). Les analyses effectuées ont révélé des concentrations moyennes annuelles en métaux (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn) et en polluants organiques (HAP, PCB) nettement inférieures au niveau 1 de référence défini dans le cadre de la convention d'Oslo, reflétant le caractère sain de ces sédiments (Alzieu et (coord), 2003). Cependant, des bioessais réalisés sur le développement embryon-larvaire de *Mytilus edulis* ont révélé une importante embryotoxicité des éluviats sédimentaires. En comparaison, des niveaux de contamination significativement plus élevés ont été obtenus dans les sédiments prélevés dans la baie de la Rochelle. Cependant, très peu d'effets embryotoxiques ont été observés pour ces sédiments. Les sources potentielles d'eutrophisation et de contamination (pesticides, produits antibiotiques) liées aux effluents domestiques et aux activités piscicoles du Fier d'Ars ont donc été également déterminées. Cependant, aucune de ces hypothèses n'a permis de mettre en évidence une contamination significative du site d'où la recherche de peptaïbols entreprise dans cette zone.

III.2.2. Détection et identification des peptaïbols par spectrométrie de masse

La détection et l'identification des peptaïbols dans les échantillons de sédiments et de moules ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation par électronebulisation (ES) et d'une trappe d'ions (TI).

Parmi les méthodes analytiques, la spectrométrie de masse (SM) occupe une place privilégiée, principalement grâce à sa sensibilité et ses limites de détection inégalées. Elle correspond à une méthode de caractérisation de la matière reposant sur la détermination des masses des molécules présentes dans un échantillon. Elle permet la transformation des molécules en ions à l'état gazeux. La masse moléculaire des analytes est alors déterminée en analysant les rapports masse/charge (m/z) des différents ions constitués d'ions pseudomoléculaires et de fragments.

Dans notre étude, l'instrument utilisé est équipé d'une source d'ionisation par électronebulisation et d'une trappe d'ions (Finnigan Matt LCQTM, Thermo Separation Products, San Jose, CA, USA). Par rapport aux premières méthodes d'ionisation permettant le transfert des ions en solution en phase gazeuse (FAB, désorption), l'ionisation par électronebulisation est une méthode particulièrement douce, donnant lieu à l'ionisation des molécules étudiées sans fragmentation induite. Cette technique permet ainsi la détermination directe des masses moléculaires des composés. Associé à une trappe ionique quadripolaire autorisant l'isolement et la fragmentation sélective (SMⁿ) des ions produits, la résolution structurale des composés est également envisageable. La SM-ES-TI représente ainsi un outil puissant dans l'analyse qualitative et quantitative des peptides et des protéines (Cole, 1997). Largement utilisée dans l'analyse des peptaïbols (Degenkolb *et al.*, 2003 ; Mohamed-Benkada *et al.*, 2006 ; Sabareesh et Balaram, 2006 ; Ruiz *et al.*, 2007), sa haute sensibilité

permet une caractérisation efficace des molécules même présentes en faible quantité dans une matrice partiellement purifiée.

III.2.2.1. Présentation du spectromètre à électronébulisation et trappe d'ions (ES-TI)

Le spectromètre de masse LCQTM est présenté dans la Figure III.2. Il est composé de quatre modules, qui seront succinctement abordés dans la suite de ce manuscrit :

- une source d'ionisation par électronébulisation,
- un système optique de transmission des ions,
- un analyseur constitué d'une trappe ionique quadripolaire,
- un détecteur.

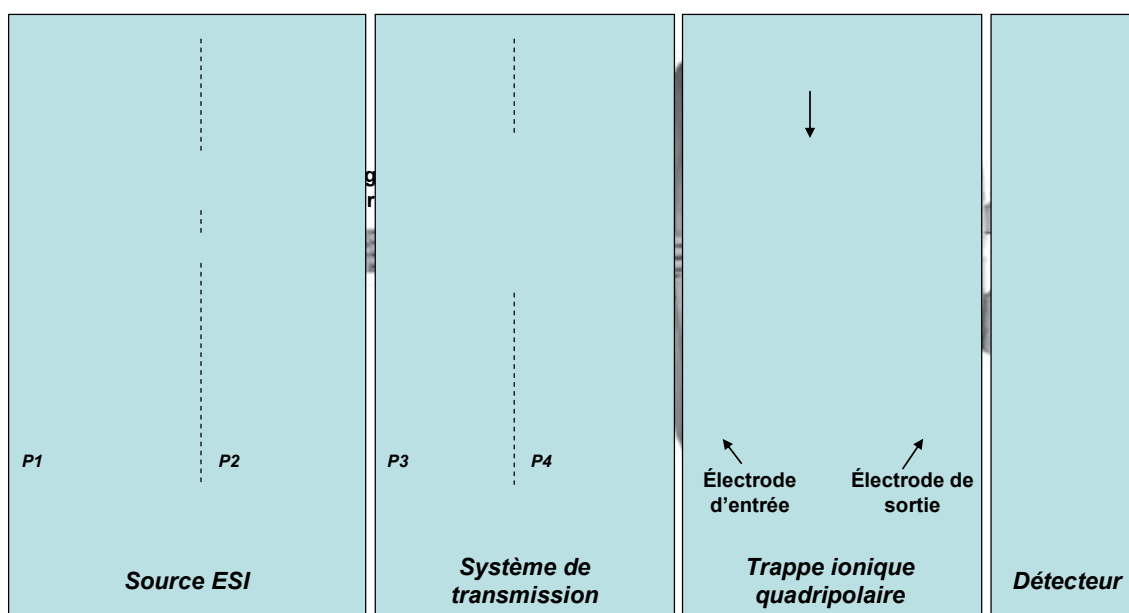


Figure III.2 : Configuration éclatée du spectromètre de masse LCQTM, équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation et d'une trappe ionique quadripolaire, d'après ThermoFinnigan Corporation.

Pressions : P1 \approx 760 Torr, P2 \approx 1 Torr, P3 \approx 1.10^{-3} Torr, P4 \approx $2,5.10^{-5}$ Torr, et P trappe \approx $1-2.10^{-3}$ Torr.

a. La source d'ionisation par électronébulisation

- Description et principe général

Le principe de l'ionisation par électronébulisation ou electrospray consiste à générer, à pression atmosphérique, des ions en phase gazeuse directement à partir des ions existants en solution sous l'effet d'un champ électrique intense. Cette technique de production des ions est devenue depuis la fin

des années 90 la technique d'ionisation la plus répandue en raison de sa sensibilité très élevée et son couplage aisé à la chromatographie liquide ou à l'électrophorèse capillaire (De Hoffmann et Stroobant, 2005). Elle autorise l'analyse d'une large gamme de composés, incluant notamment les molécules et macromolécules biologiques non volatiles et thermolabiles.

L'échantillon en solution est amené dans la source par une aiguille métallique de faible diamètre interne (environ 200 μm). Un champ électrique est obtenu par application d'un voltage élevé (de 3 à 6 kV) entre la pointe de cette aiguille et une contre-électrode. Ce champ électrique intense conduit à une séparation des charges positives et négatives au sein des espèces en solution (migration électrophorétique), qui va à terme entraîner la formation d'un spray de gouttelettes chargées. En mode de détection des ions positifs, les ions positifs migrent à la surface des gouttelettes, fortement attirés vers la contre électrode (négative), tandis que les ions négatifs sont neutralisés à la sortie de l'aiguille où ont lieu des réactions d'oxydation (le contraire se produisant en mode négatif). L'accumulation de charge à la surface du liquide provoque sa déstabilisation, il prend alors la forme d'un cône (cône de Taylor) à la pointe duquel sont émises les gouttelettes fortement chargées (Figure III.3).

Le solvant contenu dans ces gouttelettes va ensuite s'évaporer, à l'aide d'un flux d'azote, entraînant leur rétrécissement et donc une augmentation de la densité de charge. Lorsque le rayon d'une gouttelette est suffisamment faible, les forces de répulsion coulombienne deviennent supérieures à la force de cohésion du liquide et la gouttelette explose en gouttelettes filles. Ce processus d'évaporation suivie de fission de la gouttelette mère se répète pour donner des gouttelettes de plus en plus petites. La densité de charge augmente au fur et à mesure, jusqu'au moment où elle devient suffisante pour provoquer la désorption des ions. Ces ions ainsi produits peuvent être porteurs d'un grand nombre de charge dans le cas où de multiples sites ionisables ou polaires sont présents sur la molécule étudiée. Les molécules ne possédant aucun site ionisable peuvent former des ions positifs par protonation (formation de l'ion $[M+H]^+$) ou par adduits avec des ions sodium, potassium, ammonium, et des ions négatifs par déprotonation (formation de l'ion $[M-H]^-$) ou par adduits avec des ions chlorure, acétate...

A l'extrémité de la chambre d'ionisation, un capillaire chauffé assure le transfert des ions depuis la zone à pression atmosphérique vers une zone de vide primaire (1.10^{-3} Torr). Il permet de compléter la désolvatation des ions, notamment lors de débits élevés ($>100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). En sortie de ce capillaire, une lentille tubulaire (Tube Lens ou Tube Gate) permet de focaliser sélectivement les ions vers l'entrée du cône d'écrémage (Skimmer). Le voltage appliqué au niveau de cette lentille (± 200 V) est dépendant de la masse des ions et de leur charge, et permet de contrôler la quantité d'ions transférés à l'analyseur.

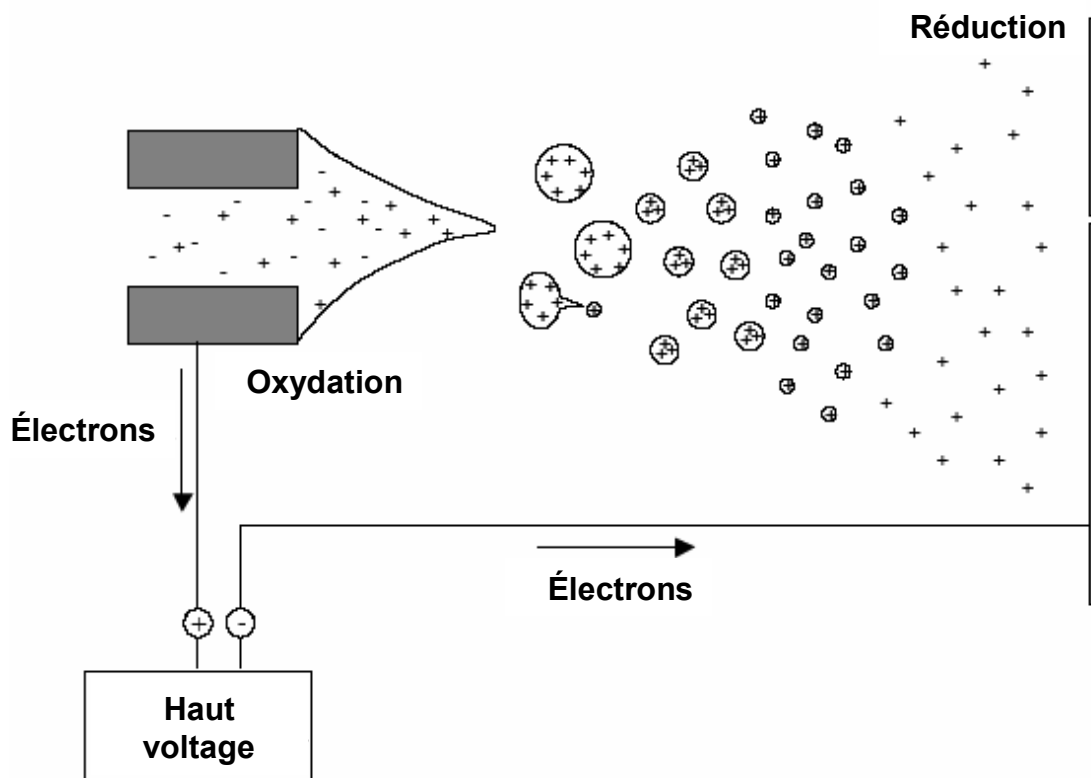


Figure III.3 : Représentation schématique du processus de l'électronébulisation pour la formation des ions positifs (d'après Bökman, 2002).

- Paramètres ajustables

Différents paramètres de l'appareil sont ajustables. Leur modification pourra permettre d'améliorer la sensibilité de détection des analytes.

- **Introduction de l'échantillon.** L'échantillon peut être introduit dans la source par perfusion directe à l'aide d'une pompe à seringue ou par couplage CLHP (phase inverse); les débits acceptés vont de moins de $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ à $1 \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Le solvant de solubilisation de l'échantillon joue un rôle important dans l'efficacité d'ionisation des molécules par électronébulisation : les solvants les plus favorables à ce processus sont les solvants polaires volatils de faible tension de surface et conductivité (méthanol, acétonitrile, isopropanol). Les sels, acides et bases fortes sont à proscrire à une concentration supérieure à 10 mM.
- **Mode de détection des ions.** En fonction du mode de détection choisi, la valeur du voltage appliqué à la pointe de l'aiguille de l'ES sera positive en cas de détection des cations et inversement pour la détection des anions. Le voltage appliqué est usuellement compris entre ± 3 et ± 6 kV: trop élevé, il pourra induire une fragmentation des ions, trop faible, il provoquera une mauvaise transmission de ces derniers.

- **Débit du gaz vecteur et auxiliaire.** Le gaz vecteur, constitué d'azote, permet la nébulisation de la solution et l'évaporation du solvant. Son débit est généralement fixé à 60 UA (unités arbitraires) pour un échantillon délivré à $3 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, et à 80 UA pour un débit de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Un flux d'azote secondaire (gaz auxiliaire) est introduit pour des débits supérieurs à $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, afin d'assister le gaz vecteur dans les processus de nébulisation. Il permet également de maintenir un taux d'humidité le plus faible possible au niveau de la source. Le débit de ce gaz auxiliaire est usuellement compris entre 10 et 20 UA.
- **Température et voltage du capillaire chauffé.** La température du capillaire chauffé (généralement comprise entre 150 et 300 °C) favorise la désolvation des ions, elle peut être optimisée en fonction de la nature du solvant et du débit d'introduction de l'échantillon. Un voltage, usuellement compris entre 0 et $\pm 132 \text{ V}$ et de polarité identique à celle des ions analysés, est également appliqué au niveau de ce capillaire afin de repousser les ions vers le cône d'écrémage.
- **Voltage supplémentaire de la lentille tubulaire.** Un voltage additionnel, compris entre 0 et $\pm 40 \text{ V}$ et de polarité identique à celle des ions analysés, peut être appliqué à la lentille tubulaire afin d'accélérer les ions dans le gaz vecteur (tube lens offset voltage). Les collisions ainsi provoquées favorise la désolvation et augmente la sensibilité de détection. Si le voltage appliqué est trop élevé, on peut assister à une fragmentation des ions, appelée dissociation induite par collision ou ion source collision induced dissociation (CID).

b. Le système optique de transmission

Le système optique de transmission est constitué de deux octopôles séparés par une lentille. Ce système assure une transmission focalisée des ions vers l'analyseur (trappe ionique). Un champ électromagnétique guide et accélère les ions le long de l'axe de chaque octopôle. La lentille inter-octopôle participe à la focalisation des ions mais joue également un rôle de cloison entre le premier octopôle et la zone de vide secondaire ($2 \cdot 10^{-5} \text{ Torr}$). Elle permet ainsi de stopper la transmission des grosses particules chargées, responsables de bruits de fond importants.

- **Paramètres ajustables**

- **Voltages des octopôles et de la lentille inter-octopôle.** Les potentiels appliqués peuvent être optimisés de manière à contrôler le courant des ions arrivant à l'analyseur. Le voltage des octopôles varie de 0 à $\pm 135 \text{ V}$, et celui de la lentille inter-octopôle de 0 à $\pm 300 \text{ V}$. La polarité des voltages appliqués sera l'inverse de celle des ions analysés.

c. La trappe ionique quadripolaire

La trappe ionique quadripolaire est constituée d'un ensemble de trois électrodes ; une électrode annulaire centrale (ring electrode), une électrode d'entrée et une électrode de sortie (end cap electrodes). Leur surface interne hyperbolique forme une cavité dans laquelle est réalisé le piégeage des ions, l'analyse des masses, l'isolement spécifique d'un ion et sa fragmentation.

L'électrode annulaire est utilisée pour générer un champ électrique quadripolaire qui permet de piéger les ions et de les retenir au centre de la trappe, en leur faisant décrire des trajectoires complexes, amorties par une faible pression d'hélium (1.10^{-3} Torr), introduit de façon continue dans la trappe. Ce flux d'hélium permet de freiner les ions et ainsi d'augmenter l'efficacité de piégeage, mais également d'améliorer la résolution via la stabilisation de la trajectoire des ions piégés. Pour analyser les ions présents, la tension et la fréquence des trois électrodes sont progressivement augmentées. L'amplitude d'oscillation des ions croît, en fonction de leur fréquence de résonance propre, dans la direction axiale orientée vers les orifices des électrodes d'entrée et sortie. Les ions sont alors éjectés dans l'ordre croissant de leur rapport m/z . La partie éjectée vers l'électrode de sortie est captée par le détecteur.

La fragmentation d'un ion spécifique peut également être conduite au sein de cette trappe. Tous les ions sont alors éjectés par application, sur les électrodes d'entrée et de sortie, des fréquences de résonance de ces ions à l'exception de celle de l'ion d'intérêt. Ensuite, la fréquence de résonance de l'ion d'intérêt est appliquée. Il rentre alors en collision avec l'hélium, à une énergie suffisante pour induire des fragmentations. Les fragments, n'ayant pas la même fréquence de résonance que celle de l'ion parent, n'entrent pas en résonance et sont immédiatement focalisés au centre de la trappe. Les fragments sont ensuite éjectés de façon séquentielle vers le détecteur.

- Paramètres ajustables

- **Le temps de remplissage de la trappe** (de quelques ms à quelques centaines de ms, voire 1 s) peut être ajusté de manière à contrôler le nombre d'ions piégés dans la trappe et d'éviter ainsi les effets de charges liés à des quantités trop importantes d'ions, ayant pour conséquence une diminution de la résolution et de la précision de mesure.
- **Mode d'analyse et vitesse de balayage des tensions.** La résolution est augmentée lorsque la vitesse de balayage des tensions (la vitesse d'éjection des ions) diminue. En conséquence, différents modes d'analyses sont disponibles permettant différentes résolutions.
- **Conditions de fragmentation.** La fenêtre d'isolement doit être ajustée de manière à sélectionner de façon optimale l'ion parent. Cette fenêtre ne doit pas être trop grande ; sinon la fragmentation des autres ions à proximité entraînera l'observation d'ions fragments supplémentaires compliquant l'interprétation des spectres. L'énergie de collision peut être optimisée de manière à obtenir un signal optimal pour un ion fragment d'intérêt particulier.

d. Le détecteur

Le détecteur est constitué d'une dynode de conversion qui permet de détecter respectivement les ions positifs ou négatifs. Un multiplicateur d'électrons transforme le courant ionique en un courant électrique et l'amplifie, induisant un potentiel proportionnel à l'intensité du signal.

Dans les pages suivantes, nous présenterons la mise en évidence de peptaïbols, par spectrométrie de masse, dans les échantillons de sédiments et de moules prélevés à différentes périodes sur le site du Fier d'Ars.

III.2.3. Article 1

1116

CHEMISTRY & BIODIVERSITY – Vol. 4 (2007)

Peptaibols: Stable Markers of Fungal Development in the Marine Environment

by Laurence Poirier^a), Monique Montagu^a), Anne Landreau^b), Mustapha Mohamed-Benkada^a), Olivier Grovel^a), Claire Sallenave-Namont^a), Jean-François Biard^a), Claude Amiard-Triquet^a), Jean-Claude Amiard^a), and Yves François Pouchus^{*a})

^a) Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, SMAB, EA2160, Faculté de pharmacie, 1 rue G. Veil, BP 53508, F-44000 Nantes

(phone: +33-240-412-870; fax: +33-240-412-858; e-mail: yves-francois.pouchus@univ-nantes.fr)

^b) Université d'Angers, Faculté de Pharmacie, Boulevard Davier, F-49000 Angers

Different peptaibols were observed in both fresh and frozen marine sediments collected from a marine area devoted to bivalve culture (Fier d'Ars, Atlantic coast, France). The identification of the peptaibols was based on a three-step mass-spectrometric analysis: observation of doubly charged ions with a characteristic isotopic profile, cleavage and observation of C- and N-terminal fragments, and partial sequencing of the N-terminal segments. The MS characteristics indicated numerous similarities between the peptaibols detected and those produced by different strains of *Trichoderma* species isolated from fresh sediments. Peptaibols were also detected in mussel samples collected at the same site. This constitutes the first observation of contamination of the marine human-food chain by fungal metabolites. Since peptaibols were readily observed both in fresh sediments and in samples kept frozen for several years, these compounds can be considered as stable markers of the development of *Trichoderma* in the marine environment.

Introduction. – Mussel consumption could represent a risk for human health because of the numerous possibilities of natural and chemical contamination of shellfish. Phycotoxins [1], produced by microalgae and accumulated in shellfish during filtration, constitute the main problem of contamination. Bacterial toxins [2] and chemical contaminants such as metals and persistent organic pollutants [3–6] represent other additional and significant sources of toxicity for shellfish and their consumers.

During the early 1990s, several cases of unexplained toxicity were observed in cultivated shellfish populations along the French Atlantic coast. No known factors of toxicity have been found to be responsible for these episodes. The hypothesis of a fungal contamination with a production of toxic metabolites has been proposed. Isolation of fungi from shellfish and sediments collected in farming areas showed that numerous saprophytic strains – mainly belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, or *Trichoderma* – were present in these zones [7]. Toxicities of these strains were studied using different biological tests on laboratory cultures realized in marine-like conditions. Among them, different strains of *Trichoderma* species exhibited an important acute toxicity on different larval models (Diptera or Crustacean larvae). The toxic principles responsible for this activity were isolated and identified as peptaibols [8][9].

Peptaibols are specific metabolites of saprophytic filamentous fungi. They are small linear peptides (with up to 20 amino acid residues), with a particular medium polarity due to their structure: peptaibols are characterized by a high content of α -amino-isobutyric acid (Aib, U), an N-terminus generally acetylated, and a C-terminus linked to an amino alcohol [10]. Peptaibols exhibit a variety of biological activities as a consequence of their membrane-modifying and pore-forming properties [10][11]. Thus, antibacterial, antifungal, occasionally antiviral, antiparasitic, and neurotoxic activities have been reported [12–16]. Peptaibol-producing strains are in particular used in biocontrol for plant protection [17].

In a previous study, experimental contamination showed that peptaibols could be accumulated in filter feeder mollusks (*Mytilus edulis*), when present in the seawater as soluble compounds [18]. This indicates that shellfish can accumulate such toxins and that a potential risk exists for the consumers if these toxic metabolites are present in natural samples. At the same time, different samples of sediment, collected in Ré Island (Atlantic coast, France) for ecotoxicological studies, exhibited a high toxicity on the embryogenesis of Blue Mussel larvae (*Mytilus edulis*) in the absence of significant contaminations (metals, PCBs, HAPs, pesticides, antibiotics) or eutrophication [19]. As peptaibols are toxic for different larval models [8][20][21], their presence in these samples has been proposed to rationalize the observed embryotoxicity.

In this report, we describe the detection of peptaibols in fresh and frozen marine sediments as well as in Blue Mussel samples collected from this site.

Results and Discussion. – 1. *Detection of Peptaibols in Frozen Sediment Samples.* In 1999, toxicity of sediment samples was shown by a bioassay based on bivalve embryonal development of *Mytilus edulis* [19]. As no explanation could be found to rationalize this toxicity, samples were kept in frozen state for more than five years for further investigations. According to the embryotoxicity results, the search began with the most toxic frozen sample collected in August 1999 (see *Table 1* below).

Long-chain peptaibols, comprising 17–20 residues, can be visualized in sediment extracts using electrospray-ionization ion-trap mass spectrometry (ESI-IT-MS). They appear in the mass spectra in the form of Na^+ adducts, with a typical peptidic isotopic profile. The corresponding ions can be singly charged ($[M + \text{Na}]^+$), with m/z values in the range 1400–2100, or doubly charged ($[M + 2 \text{Na}]^{2+}$), with m/z values of 700–1100. This latter form is the most apparent one in neutral medium [9]. Scanning the spectrum between these limits in high-resolution mode with an interval of 10 u (zoomscan) allows one to observe complex doubly charged ions. In *Fig. 1*, the regions of the quasi-molecular ion peaks of a peptaibol compound are shown, the corresponding $[M + 2 \text{Na}]^{2+}$ and $[M + \text{Na}]^+$ ions appearing at m/z 998.2 (a) and m/z 1973.5 (b), respectively.

In the frozen sediment sample collected in August 1999, six different doubly charged ions with the searched isotopic profile were observed between m/z 881.5 and 1012.5 (*Table 1*). The corresponding singly charged $[M + \text{Na}]^+$ ions were searched in the same acquisition mode (zoomscan). Three of them could be reasonably well detected (signal/noise > 3 : 1) at m/z 1740, 1959, and 1973, respectively. The others were present in too small amounts to allow their detection. The corresponding molecular weights were then calculated (*Table 1*). A query for the observed ions in the peptaibol

1118

CHEMISTRY & BIODIVERSITY – Vol. 4 (2007)

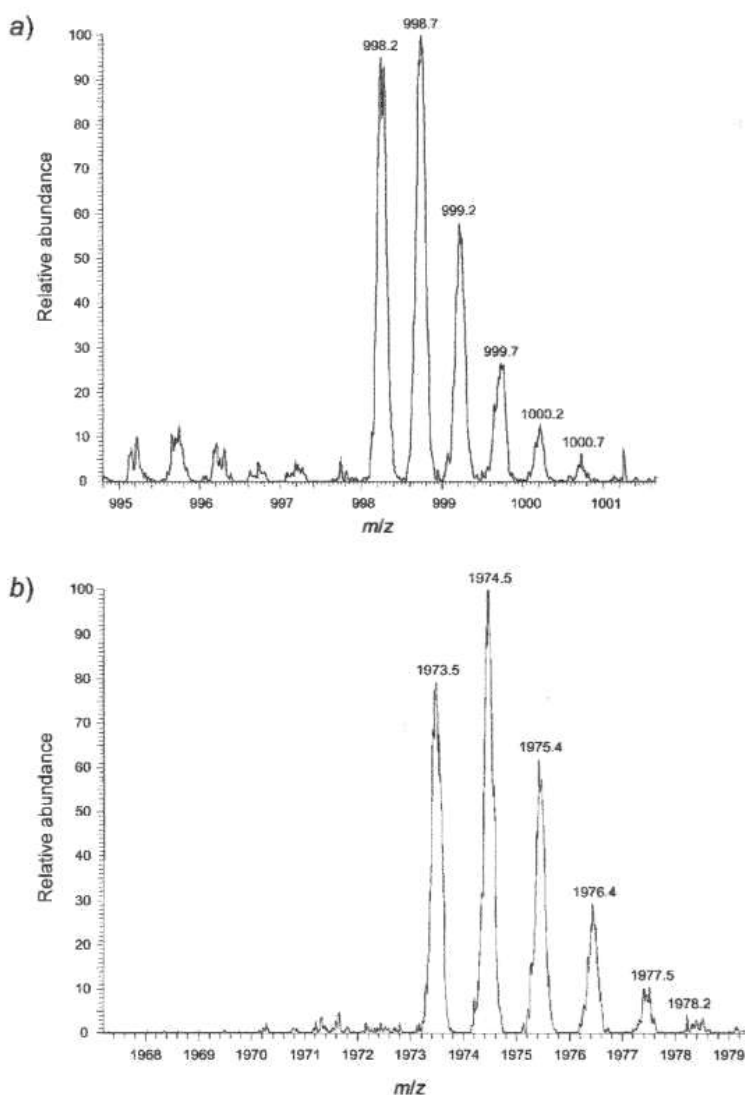


Fig. 1. Mass-spectrometric isotopic profiles of quasi-molecular ion peaks of peptaibols in a frozen sediment sample from the French Atlantic coast collected in August 1999. Recorded under neutral conditions, and scanned in high-resolution mode (zoomscan). a) $[M+2Na]^{2+}$ Adduct at m/z 998.2, with 0.5 u between consecutive peaks. b) $[M+Na]^+$ Adduct at m/z 1973.5, with 1 u between peaks.

database [22] showed that, except for the last one (M_r 1979 Da), peptides with such molecular weights have already been described from fungal species, all belonging to the genus *Trichoderma* or its teleomorph *Hypocrea*.

2. *Mass-Spectrometric Elucidation of Peptaibol Structures and Sequences.* The MS/MS (MS^2) fragmentation of long-chain peptaibol ions generally produces two main fragments, an N- and a C-terminal one, by breaking a bond between an Aib (U) and a proline (P) residue. Observation of this cleavage can confirm the peptaibolic nature of

Table 1. *Mass-Spectrometric Characteristics of Peptaibols in Frozen Sediment and Mussel Samples*. The analysis was done in regular ESI-MS mode (Na^+ adducts) and in MS² mode (fragmentation of N- and C-terminal parts). Plus (+) indicates that the corresponding ion was observed.

Observed ions [<i>m/z</i>] [<i>M</i> +2 Na] ²⁺	<i>M_r</i> [Da] ^{a)}	Major fragments [<i>m/z</i>]		Sediment samples ^{b)}						Mussel samples ^{b)}			
		N-terminus	C-terminus	08 1999	03 1999	04 1999	07 1999	11 1999	01 2000	A-04 1999	B-04 1999	C-04 1999	10 1999
881.5	1717	1163	554	+	+	+			+	+	+	+	
888.4	1731	1177	554	+		+				+		+	
991.2	1936	1163	773	+									
998.2	1950	1177	773	+									
1005.6	1965	1163	802	+				+		+		+	
1012.5	1979	1177	802	+						+		+	

^{a)} Calculated molecular weight. ^{b)} Listed according to collection date. ^{c)} Only peptaibol-containing samples are given.

1120

CHEMISTRY & BIODIVERSITY – Vol. 4 (2007)

the observed compounds. The six Na^+ adducts reported in *Table 1* were, thus, further fragmented by ESI-IT-MS. They all gave several secondary products, with main cleavages leading to major ions (*Table 1*). The fragments at m/z 1163 and 1177 have already been described as the N-terminal parts of 29 known peptaibols [22]. In the same way, the ions at m/z 773 and 802 have been observed in 39 described peptaibols as the C-terminal parts. Peptides with molecular weights of 1936 and 1950 Da exhibited the same cleavages (m/z 1163–773 and 1177–773, resp.) as twelve known peptaibols, all produced by fungi of the genus *Trichoderma*.

In the ion trap, the observed ions were present in too small amounts to allow their complete amino acid sequences to be determined. However, partial sequencing of singly or doubly charged ions was possible for four of them, those with molecular weights of 1717, 1936, 1950, and 1965 Da, as exemplified in *Fig. 2* for the $[M+\text{Na}]^+$ signal at m/z 1740. The identified (partial) sequences are collected in *Table 2*. As can be seen, all of the identified sequences included the common sub-sequence Q-U-Vx-U-G-Lx-U, Vx referring to valine (V) or isovaline (J), and Lx denoting leucine (L) or isoleucine (I). This sub-sequence has been found in 35 already known peptaibols, all produced by ascomycetous fungi belonging to the genus *Trichoderma*.

All of these observations allow attribution, with a high degree of certainty, of the observed ions to peptaibols produced by fungi of the genus *Trichoderma*. This constitutes the first *direct* observation of fungal metabolites in the natural marine environment. Detection of the observed doubly charged ions has been carried out in

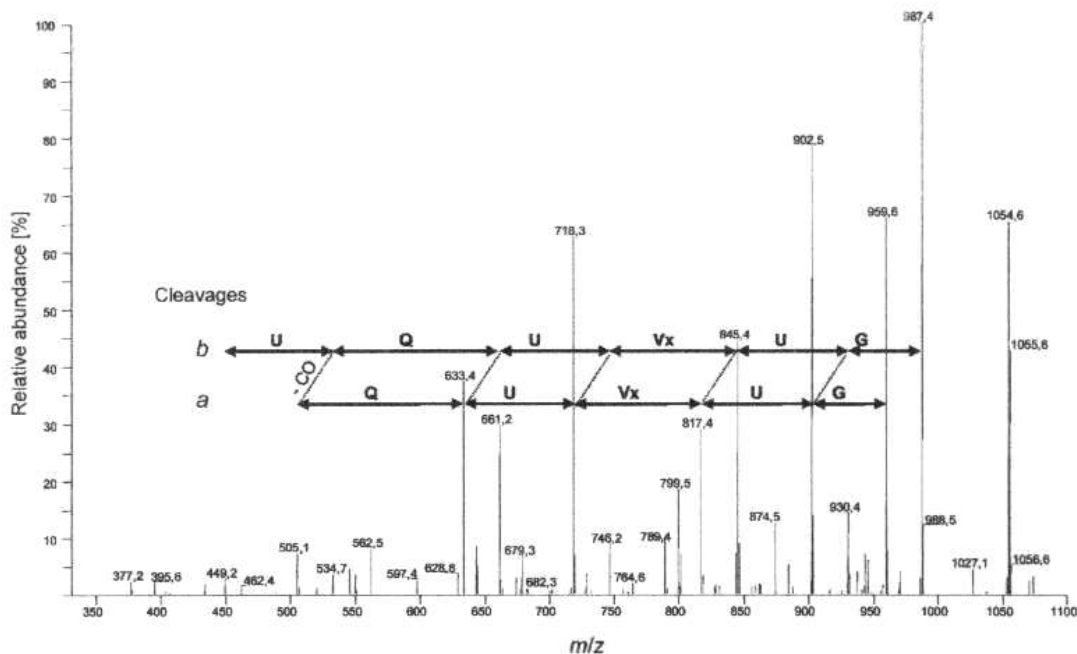


Fig. 2. Partial sequencing by MS^3 analysis of the N-terminal segment of one of the observed peptides (full MS^3 of m/z 1740). Main fragments appear in two forms corresponding to the cleavage series a and b [23].

Table 2 (cont.)

$M_r^a)$	N ^{b)}	C ^{c)}	N-Terminal sequence ^{d)}			C-Terminal sequence						Name	Isolated from							
			U	A	A	U	U	Q	U	V	U			U	Q	Q	FOH			
1950	1177	773	Ac	U	A	U	A	U	U	Q	U	V	U	U	U	Q	Q	FOH	Longibrachin A III	<i>T. longibrachiatum</i>
1950	1177	773	Ac	U	A	U	A	U	U	Q	U	V	U	U	U	Q	Q	FOH	Trichokonin VIII	<i>T. koningi</i>
1950	1177	773	Ac	U	A	U	A	U	U	Q	U	V	U	U	U	Q	Q	FOH	Trichosporin TS-B-IVc	<i>T. polysporum</i>
1951	1163	788	Ac	U	A	U	A	U	U	Q	U	V	U	U	J	E	Q	FOH	Longibrachin B III	<i>T. longibrachiatum</i>
1962	1189	773	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	U	U	Q	Q	FOH	Alamethicin F-50	<i>T. viride</i>
1962	1189	773	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	U	U	Q	Q	FOH	Atroviridin A	<i>T. atroviride</i>
1963	1189	774	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	U	U	E	Q	FOH	Alamethicin F-30	<i>T. viride</i>
1964	1177	787	Ac	U	A	U	A	U	U	Q	U	V	U	U	J	Q	Q	FOH	Longibrachin A IV	<i>T. longibrachiatum</i>
1976	1189	787	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	U	J	Q	Q	FOH	Atroviridin B	<i>T. atroviride</i>
1976	1203	773	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	U	U	Q	Q	FOH	Polysporin B	<i>T. polysporum</i>
1977	1203	774	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	U	U	E	Q	FOH	Alamethicin II	<i>T. viride</i>
1990	1203	787	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	U	J	Q	Q	FOH	Atroviridin C	<i>T. atroviride</i>

^{a)} Molecular weight (in Da) of peptaibol. ^{b)} M_r of N-terminal fragment. ^{c)} M_r of C-terminal fragment. ^{d)} Bold residues are part of commonly observed peptaibol sub-sequences; 'x' denotes 'not identified'.

five other sediment samples collected from the same site over a period of nine months. The same peptaibols were observed mainly in the samples collected in April 1999 and January 2000 (Table 1). Unfortunately, their amounts were too small to allow complete identification. To corroborate these results, we decided to investigate the presence of *Trichoderma* species and peptaibols in fresh sediments, collected from the same site in March 2006.

3. *Study of Fresh Sediment Samples.* Different fungal strains were isolated from cultures of fresh sediment samples, collected in March 2006, realized on a solid medium prepared with seawater. Three of these strains (T1, T2, and T3) were found to belong to the genus *Trichoderma* (Table 3). The morphologically identical strains T1 and T2 were related to the already identified marine strain of *T. longibrachiatum* [9]. The third one, T3, was morphologically different. The strains were cultured and extracted to study their production of peptaibols.

Long-chain peptaibols were searched in fresh-sediment and fungal-culture extracts. The results of these experiments are given in Table 3. The morphological differences observed between the isolated fungal strains were confirmed: the strains T1 and T2 both produced the same peptaibols, which were different from those produced by the T3 strain. This finding is of potential interest in terms of the chemotaxonomy of marine *Trichoderma* species, as judged on the basis of produced peptaibols.

Table 3. *Mass-Spectrometric Traces of Observed Peptaibols in Fresh Sediments and Fungal Cultures.* Plus (+) indicates that the corresponding ion was observed.

$[M+2Na]^{2-}$ [m/z]	$[M+Na]^+$ [m/z]	M_r [Da]	Fresh sediments		Isolated <i>Trichoderma</i> strains		
			Sample 1	Sample 2	T1	T2	T3
896.7	1770.4	1747					+
903.7	1784.4	1761					+
910.6	1798.2	1775					+
917.7	1812.4	1789					+
955.7	1888.4	1865			+	+	
962.7	1902.4	1879			+	+	
991.2	1959.4	1936	+	+	+	+	
998.2	1973.4	1950	+	+	+	+	
1005.6	1988.2	1965			+	+	

In the sediment samples, two significant peptaibols were observed at m/z 991.2 and 998.2, corresponding to peptides produced by the isolated T1 and T2 strains, and already observed before in frozen sediment samples. The MS² spectra obtained for m/z 991.2 from the fungal cultures and sediment extracts (frozen or fresh) were similar (Fig. 3). This was also observed for ions at m/z 998.2. These results confirmed the conclusions made for peptaibols detected in frozen samples. The sequences of these peptaibols were determined as described above by MSⁿ fragmentation. Similarity to longibrachins or trichokonins, produced by *T. longibrachiatum* and *T. koningii*, was observed.

4. *Peptaibol Screening in Frozen Shellfish.* To determine whether peptaibols may contaminate filtrating shellfish in farming areas, as it was shown in the laboratory [18], frozen mussel samples, collected at the same site and during the same period as the

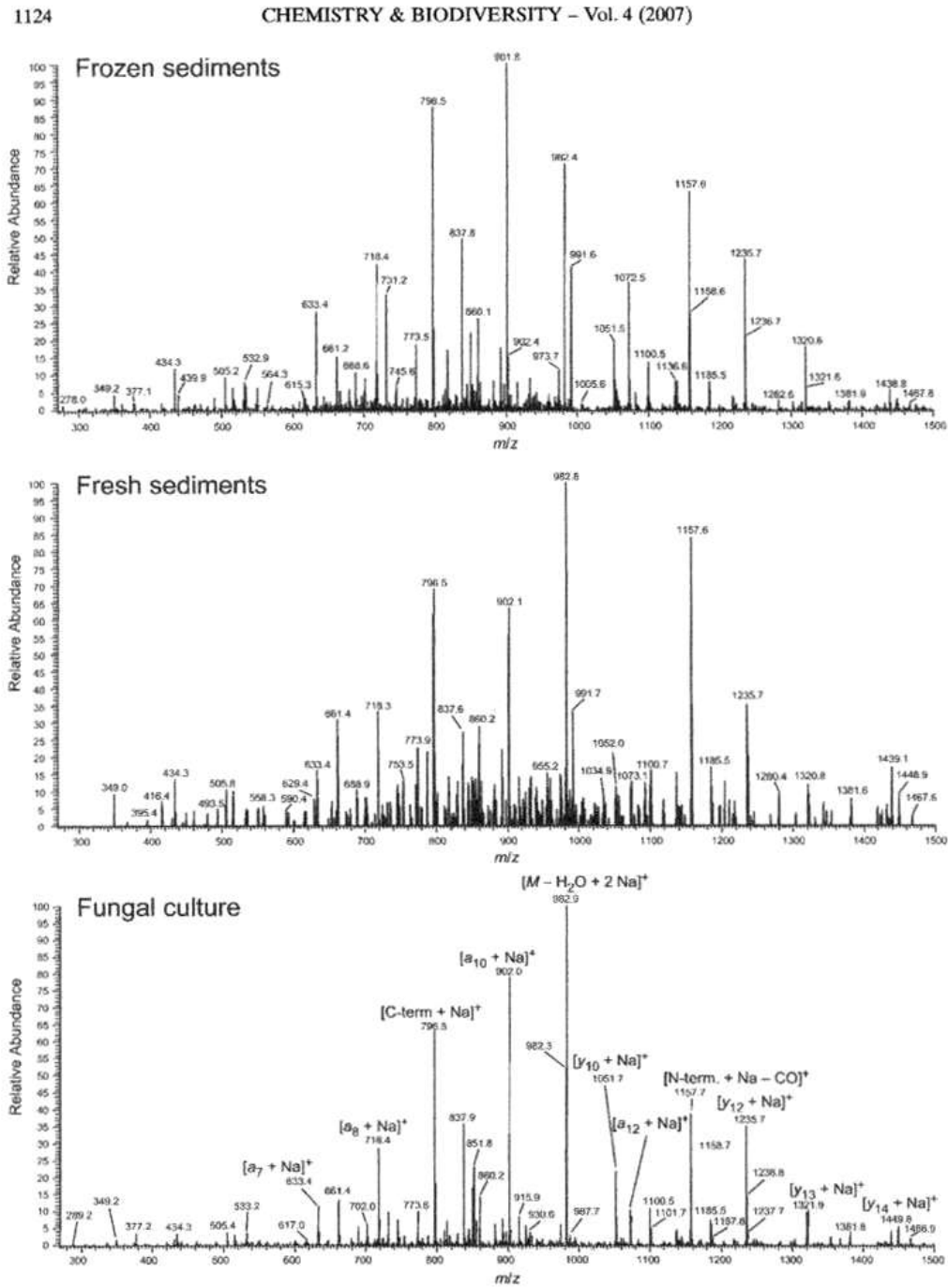


Fig. 3. MS^2 Spectra of the $[M + 2 Na]^{2+}$ parent ion at m/z 991.2 of the chromatographically purified extracts of frozen sediment (top), fresh sediment (center), and of *Trichoderma* species (bottom). x-Axis: m/z ; y-axis: rel. abundance (%). For details, see *Exper. Part*.

sediments, were analyzed. Four out of the six peptaibols previously observed in sediments were detected also in these mussel samples (*Table 1*). By means of MS² fragmentation, they were identified by comparison with the mass spectra obtained from the sediment samples (*Fig. 4*). Their relative yields were lower in the mussel samples than in the sediments.

The contamination of shellfish with peptaibols suggest the following mechanism. During the development of *Trichoderma* species in the sediment layer, peptaibols were produced, then solubilized in the aqueous layer, and finally concentrated in shellfish by filtration. Our results, thus, constitute the first *direct* observation of contamination of the human marine food chain by toxic fungal metabolites.

Conclusions. – *Trichoderma* species have been isolated before from marine sediments in Japan and South China [24], and in France [7]. Their ability to grow in hypersaline environment has been demonstrated under laboratory marine-like culture conditions [8], but they have never been directly observed in the natural marine environment. The identification of peptaibols in marine natural samples, as described herein for the first time, can be considered as a proof of the development of *Trichoderma* species in marine sediments; thus, peptaibols may be used as markers of the fungal development in this environment. As they were observed in samples conserved in a frozen state for several years, they can be considered as stable markers of contamination of marine samples by fungi belonging to the genus *Trichoderma*.

Contamination of shellfish was also observed. The presence of such compounds in marine areas devoted to bivalve culture could represent a risk for shellfish populations, and a poisoning risk through the consumption of contaminated shellfish. Further investigations on the bioactivity of peptaibols, as well as on analytical methods allowing their precise determination in the marine environment, are required to determine the level of these risks more precisely. Bioassays on bivalve embryogenesis will provide information on the toxicity of peptaibols for population dynamics. And bioaccumulation of these compounds by shellfish could be estimated through experimental contamination studies.

This work is part of the national program PNETOX of the French ministry *Ecologie et Développement durable*. Thanks are due to E. Gilet, C. Robiou du Pont, and T. Robiou du Pont for their technical participation, and to C. Grovel for English language revision.

Experimental Part

1. *General.* Methanol (MeOH), dichloromethane (CH₂Cl₂), and hexane were from *Carlo Erba* and distilled prior to use; ethanol (EtOH; APC 99.8%) and acetonitrile (MeCN) were from *Baker* and of HPLC grade. Fungal cultures were grown in peptone/dextrose/agar medium (*Difco*) using sterile natural seawater (11) in *Petri* dishes (20-cm diameter). Vacuum liquid chromatography (VLC): diol phase gel (*Nucleoprep 100-30 OH; Macherey-Nagel*). MS and MSⁿ analyses: LCQ apparatus (*Thermo Fisher Scientific*); in *m/z*.

2. *Frozen Sediment and Mussel Samples.* Superficial sediment (*n*=6) and mussel samples (*n*=10) were collected in Fier d' Ars (Ré Island, France; 46° 13' N, 1° 29' W) from March 1999 to January 2000. Superficial sediments (depth <1 cm) were scraped with a plastic blade and placed in a plastic box. Mussels were placed in clean aerated artificial seawater at the salinity of the site of origin to allow them to eliminate their gut contents (24 h). Sediments and animals were stored prior to treatment at -20°.

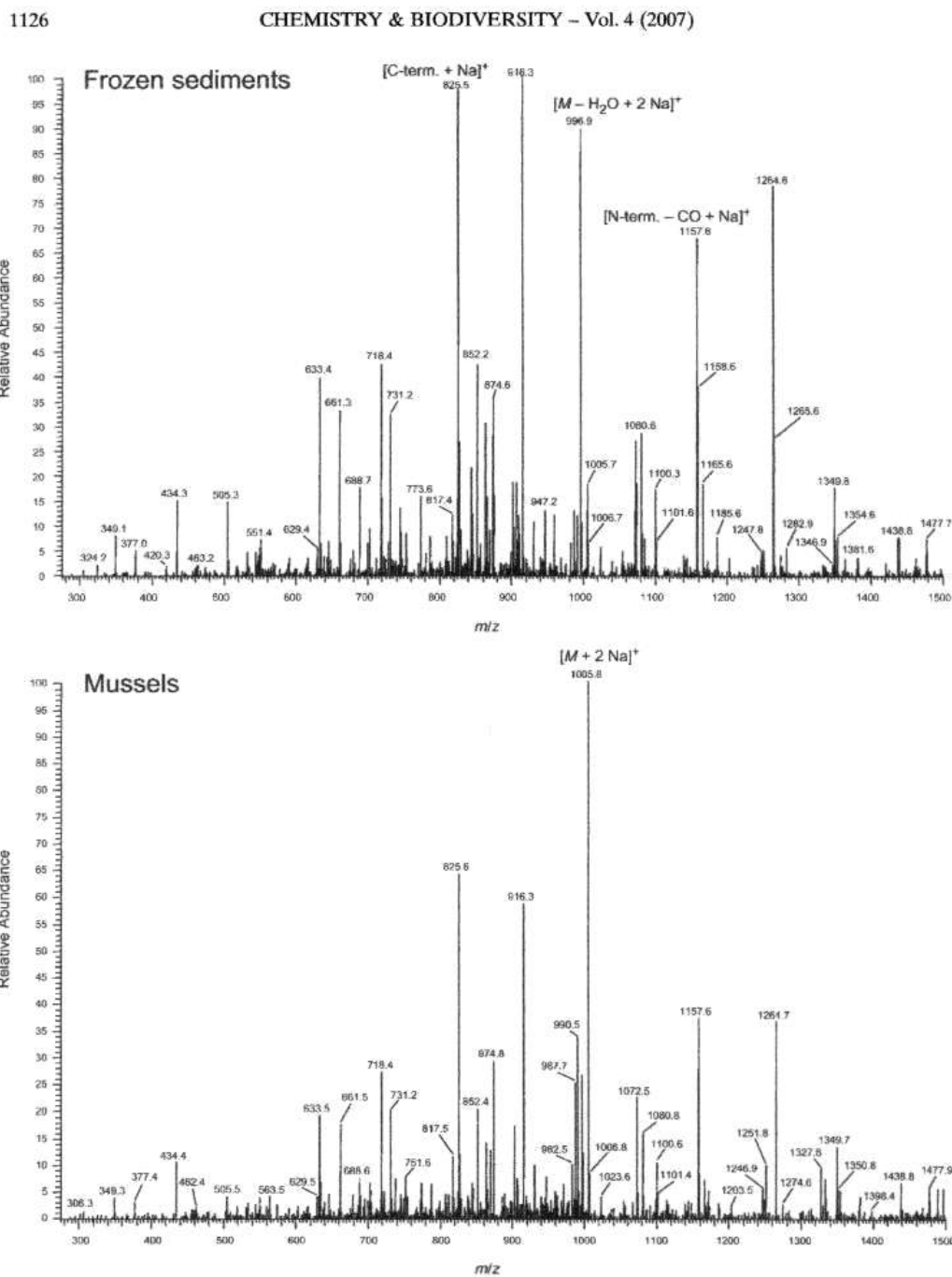


Fig. 4. MS^2 Spectra of the $[M + 2 Na]^2+$ parent ion at m/z 1005.6 of the chromatographically purified extracts of frozen sediment (top) and mussel samples (bottom). x-Axis: m/z ; y-axes: rel. abundance (%). For details, see *Exper. Part*.

3. *Fresh Sediment Samples.* Superficial sediment ($n=2$) was collected in sterile flasks from the same site in March 2006. To allow fungal isolation, they were stored for a few days at 4° before processing.

4. *Isolation of Fungal Strains and Cultures of Trichoderma Species.* All handling procedures were performed in a laminar-flow unit. Fresh sediments (1 g) were agitated in sterile seawater (10 min). After decantation, the supernatant was recovered and spread on the culture medium (4 ml/dish). Cultures were grown on sterilized medium (120°, 20 min) supplemented with chloramphenicol (50 mg/l), and incubated after inoculation (27°). Fungal strains were isolated over a period of two months, and generally identified only by genus by means of morphological observations. Each strain belonging to the genus *Trichoderma* was cultured on sterilized medium (27°, 10 d) for biomass extraction.

5. *Extraction.* 5.1. *Mussels.* Mussel tissue (10 g) was homogenized and then extracted with MeOH/H₂O 90:10 (v/v; 3 × 60 ml). The filtrate was washed with hexane (3 × 60 ml), treated with H₂O (30 ml), and then extracted with CH₂Cl₂ (3 × 60 ml). Sediment samples (10 g) were directly extracted with CH₂Cl₂ (3 × 100 ml) and dehydrated on Na₂SO₄. The org. phase obtained was evaporated to dryness, leading to the crude extracts.

5.2. *Fungi.* Fungal biomass (*Trichoderma* sp. cultures) was extracted with CH₂Cl₂/MeOH 1:2, 2:1, and 1:1 (v/v; 120 ml each). The org. phases obtained were combined and washed with dist. H₂O (90 ml) before evaporation to dryness.

6. *Purification of Extracts.* Each extract was purified by VLC, eluting with different mixtures of CH₂Cl₂/EtOH 100:0 → 90:10 (v/v). The fractions eluted with CH₂Cl₂/EtOH 90:10 were collected, evaporated to dryness, and then subjected to MS analysis.

7. *MS Analysis.* The above fractions were solubilized in MeCN/H₂O 75:25 (v/v). The resulting solns. were filtered, and then infused directly into the ESI-IT-MS apparatus at a flow-rate of 3 µl/min. MS Analyses were conducted in positive-ion mode, using conditions previously optimized for the detection of peptaibols [9]: capillary temperature 160°, capillary voltage 4.5 V, spray voltage 19 kV. Detection of doubly charged ion complexes ($[M+2Na]^{2+}$), showing the isotopic profile of peptaibols (see Fig. 1), was performed on spectra acquired in the high-sensitive mode, with an interval of 10 u (zoomscan), sweeping the mass range 700–1100 u.

MSⁿ Fragmentation was performed with singly charged ions ($[M+Na]^+$) or with the corresponding doubly charged ions ($[M+2Na]^{2+}$), under the same experimental conditions as described above for regular MS analysis. The band width used was 1 u, and the collision energy ranged from 33 to 37%. Mass differences between the product ions allowed us to establish partial amino acid sequences of the corresponding peptaibols.

REFERENCES

- [1] M. A. Quilliam, *J. AOAC Int.* **1999**, *82*, 773.
- [2] V. Sipiä, H. Kankaanpää, S. Pflugmacher, J. Flinkman, J. Furey, K.-J. James, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2002**, *53*, 305.
- [3] P. Szefer, S. W. Fowler, K. Ikuta, F. Paez Osuna, A. A. Ali, B.-S. Kim, H.-M. Fernandez, M.-J. Belzunce, B. Guterstam, H. Kunzendorf, M. Wołowicz, H. Hummel, M. Deslous-Paoli, *Environ. Pollut.* **2006**, *139*, 70.
- [4] T. Suzuki, I. Yamamoto, H. Yamada, N. Kaniwa, K. Kondo, M. Murayama, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 304.
- [5] S. A. Tittlemier, D. Forsyth, K. Breakell, V. Verigin, J. J. Ryan, S. Hayward, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7740.
- [6] B. M. Braune, P. M. Outridge, A. T. Fisk, D. C. G. Muir, P. A. Helm, K. Hobbs, P. F. Hoekstra, Z. A. Kuzyk, M. Kwan, R. J. Letcher, W. L. Lockhart, R. J. Norstrom, G. A. Stern, I. Stirling, *Sci. Total Environ.* **2005**, *351*, 4.
- [7] C. Sallenave-Namont, Y. F. Pouchus, T. Robiou du Pont, P. Lassus, J. F. Verbist, *Mycopathologia* **2000**, *149*, 21.
- [8] A. Landreau, Y. F. Pouchus, C. Sallenave-Namont, J.-F. Biard, M.-C. Boumard, T. Robiou du Pont, F. Mondeguer, C. Goulard, J. F. Verbist, *J. Microbiol. Methods* **2002**, *48*, 181.

- [9] M. Mohamed-Benkada, M. Montagu, J. F. Biard, F. Mondeguer, P. Vérité, M. Dalgarrondo, J. Bissett, Y. F. Pouchus, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 1176.
- [10] J. K. Chugh, B. A. Wallace, *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*, 565.
- [11] J. Peltola, A. Ritieni, R. Mikkola, P. A. Grigoriev, G. Pócsfalvi, M. A. Andersson, M. S. Salkinoja-Salonen, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4996.
- [12] S.-U. Oh, B.-S. Yun, S.-J. Lee, J.-H. Kim, I.-D. Yoo, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 557.
- [13] S. Rebuffat, C. Goulard, B. Bodo, M. F. Roquebert, *Recent Res. Dev. Org. Bioorg. Chem.* **1999**, *3*, 65.
- [14] B.-S. Yun, I.-D. Yoo, Y. H. Kim, Y.-S. Kim, S.-J. Lee, K.-S. Kim, W.-H. Yeo, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1429.
- [15] M. Schiell, J. Hofmann, M. Kurz, F. R. Schmidt, L. Vértésy, M. Vogel, J. Wink, G. Seibert, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 220.
- [16] P. A. Grigoriev, B. Schlegel, M. Kronen, A. Berg, A. Härtl, U. Gräfe, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 763.
- [17] T. Degenkolb, T. Gräfenham, A. Berg, H. I. Nirenberg, W. Gams, H. Brückner, *Chem. Biodiv.* **2006**, *3*, 593.
- [18] C. Sallenave, Y. F. Pouchus, M. Bardouil, P. Lassus, M.-F. Roquebert, J.-F. Verbist, *Toxicon* **1999**, *37*, 77.
- [19] C. Amiard-Triquet, O. Geffard, A. Geffard, H. Budzinski, J.-C. Amiard, D. Fichet, H. Pouliquen, M. El Hourch, Y. Berthelot, E. His, in 'Contaminated Sediments: Characterization, Evaluation, Mitigation/Restoration', Ed. H. Tremblay, J. Locat, R. Galvez-Cloutier, Université Laval, Québec, 2003, p. 349.
- [20] V. Mat'ha, A. Jegorov, M. Kiess, H. Brückner, *Tissue Cell* **1992**, *24*, 559.
- [21] A. Ritieni, V. Fogliano, D. Nanno, G. Randazzo, C. Altomare, G. Perrone, A. Bottalico, L. Maddau, F. Marras, *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1745.
- [22] L. Whitmore, J. K. Chugh, C. F. Snook, B. A. Wallace, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 663.
- [23] K. Biemann, *Ann. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 977.
- [24] Y. V. Khudyakova, M. V. Pivkin, T. A. Kuznetsova, V. I. Svetashev, *Microbiology* **2000**, *69*, 608.

Received November 30, 2006

III.3. Conclusions

L'étude réalisée sur les sédiments et les moules originaires de la zone conchylicole du Fier d'Ars a permis de mettre en évidence la présence de divers peptaïbols dans des échantillons du milieu naturel, prélevés à différentes périodes.

La détection de ces molécules dans les extraits purifiés de sédiments et de moules a été réalisée à l'aide de la SM-ES-TI. Leur identification s'est basée sur l'observation des adduits sodium bichargés $[M+2Na]^{2+}$, dont le profil isotopique caractéristique permet la détermination de la masse moléculaire et la confirmation de la nature peptidique des composés. La fragmentation en mode SMⁿ des ions observés a permis d'identifier, dans un deuxième temps, les fragments N- et C-terminaux et d'établir les séquences partielles d'acides aminés. La présence d'un Aib, acide aminé non codé et spécifique des peptaïbiotiques, permet une confirmation formelle de la nature des composés observés.

Dans les sédiments prélevés en 1999-2000, différentes molécules ont été détectées principalement dans les échantillons d'avril, d'août 1999 et de janvier 2000. Leurs masses moléculaires sont comprises entre 1717 et 1979 Da, indiquant une appartenance au groupe des peptaïbols à longue séquence. Un enchaînement commun (QUVxUGLxU) à quatre de ces molécules a été observé (Vx = Val ou Iva, Lx = Leu ou Ile). Ce motif est retrouvé dans 35 peptaïbols à longue séquence précédemment décrits et appartenant aux familles peptidiques des trichorzines, des trichokonines, des trichosporines, des alaméthazines, des atroviridines, des polysporines et des longibrachines (Whitmore *et al.*, 2003 ; Whitmore et Wallace, 2004). Ces molécules sont toutes biosynthétisées par les ascomycètes du genre *Trichoderma*. Plusieurs de ces peptaïbiotiques (les trichokonines et les trichosporines) ont déjà été mis en évidence à partir de cultures *in vitro* d'une souche de *Trichoderma koningii* isolée de coques (Landreau, 2001 ; Landreau *et al.*, 2002).

Dans les échantillons de sédiments prélevés en mars 2006, deux peptaïbols, présentant des masses moléculaires de 1936 et 1950 Da, ont été significativement observés. Ces composés sont similaires à ceux observés dans les échantillons de sédiments d'avril et d'août 1999. La comparaison de leurs caractéristiques structurales avec celles des séquences déjà référencées montre des similitudes avec certains composés des familles peptidiques des longibrachines, des trichokonines et des trichosporines.

Le prélèvement de ces sédiments frais a permis l'étude de la microfonge présente dans ces échantillons. Parmi les souches isolées, les moisissures du genre *Penicillium* sont largement représentées avec 53% des isollements, suivies des genres *Aspergillus* (10%) et *Trichoderma* (8%).

Les composés biosynthétisés par les trois souches isolées du genre *Trichoderma* ont été purifiés à partir de cultures fongiques *in vitro* et étudiés. Deux de ces souches, morphologiquement très proches, produisent des peptaïbols à longue séquence présentant de nombreuses similarités. La troisième souche présente un profil de production très différent. Les composés détectés *in situ* montrent des caractéristiques structurales identiques (masses moléculaires, profils de fragmentation) aux peptaïbols de masses moléculaires 1936 et 1950 Da, composés biosynthétisés de façon majoritaire par deux des souches de *Trichoderma* isolées. Le profil de production toxinique de ces souches dans le substrat sédimentaire semble donc similaire à celui observé sur le milieu synthétique utilisé pour la réalisation des cultures *in vitro*. Le milieu utilisé est un milieu Sabouraud (digestion enzymatique de caséine : 10 g.L⁻¹, dextrose : 40 g.L⁻¹, agar : 15 g.L⁻¹), réalisé à base d'eau de mer. Il constitue donc, dans un objectif de comparaison des composés produits *in vitro* et détectés *in situ*, un substrat de choix pour la réalisation des cultures des souches isolées du milieu marin

Concernant les échantillons de moules prélevés en 1999 parallèlement aux sédiments, des peptaïbols à longue séquence ont été détectés dans les échantillons d'avril et d'octobre 1999. Aucun peptaïbol n'a été observé dans les autres prélèvements (mars, mai, août, septembre et novembre 2003). Les molécules détectées ont montré des similitudes avec quatre des six peptides préalablement mis en évidence dans les échantillons de sédiments.

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent pour la première fois la présence de peptaïbols dans l'environnement marin. Ces métabolites apparaissent relativement stables dans la matrice sédimentaire congelée et peuvent supporter une longue période de conservation à -20°C. **Ils peuvent donc être considérés comme des marqueurs stables du développement des moisissures saprotrophes productrices. Leur détection dans des échantillons du milieu naturel apporte ainsi une preuve du développement de ces moisissures dans les écosystèmes marins benthiques.**

Leur détection dans les échantillons de moules suggère une bioaccumulation vraisemblable des peptaïbols par les bivalves filtreurs en milieu naturel. Ces observations confirment des travaux précédents au cours desquels des peptaïbols avaient été ponctuellement décelés dans des moules issues d'élevage (Landreau, 2001).

Leur présence dans les zones conchylicoles indique un risque toxique potentiel pour les organismes marins et constitue également un risque d'intoxication pour l'homme via la consommation des mollusques bivalves bioaccumulateurs.

Chapitre IV

***Développement de méthodes d'analyse
quantitative des peptaïbols dans les sédiments
marins et les mollusques bivalves***

Chapitre IV : DEVELOPPEMENT DE METHODES D'ANALYSE QUANTITATIVE DES PEPTAÏBOLS DANS LES SEDIMENTS MARINS ET LES MOLLUSQUES BIVALVES

IV.1. Contexte de l'étude

Au regard des résultats acquis dans le chapitre précédent, mettant en évidence la présence des peptaïbols et de moisissures saprotrophes productrices dans une zone conchylicole du littoral atlantique, le développement de méthodes permettant d'évaluer précisément les niveaux de concentrations environnementales et d'étudier l'éventuelle corrélation entre ces concentrations et les paramètres toxicologiques des peptaïbols paraît indispensable afin d'estimer le risque toxique potentiel pour les organismes bivalves et pour les consommateurs de coquillages. La mise au point de procédures analytiques permettant cette quantification dans les sédiments et les mollusques bivalves a donc fait l'objet de la seconde partie de ce travail.

Quelques études décrivant l'estimation semi-quantitative des différents peptaïbols isolés de cultures fongiques sont actuellement disponibles (Schirmbock *et al.*, 1994 ; Landreau, 2001 ; Psurek *et al.*, 2006). Cependant, aucune méthode relative à la quantification de ces métabolites dans les échantillons du milieu naturel n'a été développée. Dans l'environnement, les peptaïbols sont effectivement présents à l'état de traces ou d'ultra-traces, impliquant le développement de méthodes analytiques extrêmement sensibles et spécifiques. D'autre part, les matrices naturelles (sédiment ou organisme) constituent des matrices très complexes, nécessitant la mise au point avant analyse, de protocoles performants permettant une concentration et une purification maximales des molécules.

Dans cette étude, le couplage chromatographie liquide haute performance - spectrométrie de masse à ionisation par électronébulisation (CLHP/SM-ES-TI) a été choisi pour réaliser la quantification des peptaïbols à l'état de traces dans les matrices naturelles. Cette technique analytique, largement utilisée dans les domaines de l'analyse environnementale et alimentaire, présente l'avantage de coupler les capacités de séparation de la chromatographie liquide et la puissance d'identification de la spectrométrie de masse. Les propriétés spectrales des peptaïbols ne permettent pas d'utiliser les détecteurs conventionnels, ils ne fluorescent pas et très peu d'entre eux présentent une absorptivité molaire compatible avec le dosage de traces. La spectrométrie de masse, basée sur l'identification moléculaire des composés, permet une détection très sensible des analytes, même au sein de matrices complexes, comme nous l'avons précédemment montré lors de l'analyse qualitative des extraits de sédiments et de moules (Poirier *et al.*, 2007b).

Les protocoles d'extraction et de purification des échantillons ont été optimisés en fonction de la nature de chaque matrice naturelle étudiée, sédiments et moules. Dans l'étude décrite au paragraphe III.2.3 (article 1), ces étapes de préparation des échantillons suivaient les procédures préalablement mises au point pour l'extraction des peptaïbols à partir des filtrats fongiques et des

moules (Landreau, 2001). L'utilisation de ces procédures nous a permis de mettre en évidence différents peptaïbols dans les matrices environnementales. Cependant, ayant été développées à l'aide d'un biosuivi utilisant le test de toxicité aiguë sur larves de diptères, habituellement adopté pour la détection des neurotoxines, les rendements précis de récupération des analytes, obtenus à l'aide de ces procédures, n'étaient pas connus et l'optimalité d'extraction des peptaïbols à partir des matrices sédimentaires et des moules non vérifiée. Les étapes d'extraction et de purification ont donc été étudiées et optimisées à l'aide d'expériences de recouvrement des analytes. Les conditions chromatographiques ont été mises au point pour chaque matrice étudiée et les différents paramètres du spectromètre de masse ont été optimisés de manière à fournir une détection optimale des analytes dans ces matrices.

Les différentes étapes nécessaires au développement et à la validation de ces méthodes analytiques seront détaillées dans les pages suivantes.

Dans une première partie, l'optimisation des différentes conditions de détection des peptaïbols par SM-ES-TI, sera présentée.

La seconde partie exposera la méthodologie mise au point pour la détermination quantitative des peptaïbols dans la matrice sédimentaire et ses applications (article 2).

La troisième et dernière partie présentera la méthodologie développée pour l'estimation quantitative de ces métabolites dans la matrice « moule ».

IV.2. Optimisation des conditions de détection des peptaïbols par SM-ES-TI

Les conditions relatives à l'analyse des peptaïbols par SM-ES-TI ont été optimisées dans le but d'obtenir un maximum de sensibilité dans la détection de ces composés. Dans le cadre de l'étude précédente (article 1), les paramètres utilisés étaient ceux mis au point au laboratoire pour l'analyse qualitative des molécules à longue et courte séquence isolées de cultures fongiques (Mohamed-Benkada, 2006). Avant de développer des méthodes d'analyse quantitative dans des matrices complexes, il était indispensable de vérifier si le niveau de sensibilité obtenu dans ces conditions était maximal.

La sensibilité de la détection par SM-ES-TI dépend de nombreux facteurs propres à la nature de l'analyte, mais aussi liés aux caractéristiques physico-chimiques du solvant utilisé et au réglage du détecteur. L'optimisation des conditions de détection des peptaïbols a donc été conduite en plusieurs étapes : après avoir déterminé le composé de référence utilisé pour cette optimisation, le mode de détection des ions (positif ou négatif), le solvant de solubilisation des échantillons et les paramètres instrumentaux du SM (mode d'analyse, paramètres ajustables) ont été étudiés.

IV.2.1. Choix du composé « étalon »

Trois types de peptaïbiotiques commercialisés sont actuellement disponibles pour la mise au point de la quantification : des peptaïbols à 20 résidus de la famille des alaméthiines (Meyer et Reusser, 1967) et des paracelsines (Brückner et Graf, 1983 ; Brückner *et al.*, 1984 ; Brückner et Przybylski, 1984b), ainsi que des peptaïbiotiques à 16 résidus de la famille des efrapeptines (Gupta *et al.*, 1991 ; Gupta *et al.*, 1992).

Au regard des résultats obtenus mettant en évidence la présence de peptaïbols à longue séquence dans les échantillons analysés, nous avons utilisé un mélange microhétérogène d'alaméthiines hautement purifié ($\geq 90\%$), isolé d'une souche de *T. viride* (SIGMA, produit n°A 4665). Les peptaïbols à longue séquence constituent en effet le groupe le plus important et surtout le plus actif d'un point de vue biologique.

Ce produit sera utilisé pour l'optimisation des conditions de détection, mais également comme étalon pour la réalisation des calibrations. Les différentes molécules le constituant seront caractérisées précisément dans la suite de ce manuscrit (cf. IV.3.2).

La biosynthèse particulière des peptaïbols sous forme de mélanges microhétérogènes implique la présence de multiples molécules de cette famille au sein d'un même échantillon. N'ayant pas la possibilité d'obtenir un composé de référence pour chaque peptaïbol, ce produit d'alaméthiines sera utilisé comme étalon interne pour l'analyse des échantillons naturels impliquant la supposition *a priori* que les peptaïbols à longue séquence donnent tous le même signal dans des conditions expérimentales identiques. Les quantités de peptaïbols seront alors exprimées en gramme d'alaméthiine. L'utilisation de ce produit comme étalon restreint cependant la possibilité de quantification des molécules à courte séquence dont l'ionisation est très différente de celle des composés à longue séquence. Cela induira en conséquence une sous-estimation des concentrations totales en peptaïbols.

IV.2.2. Choix du mode de détection des ions

Compte tenu du nombre important de peptaïbols connus et de leur diversité de masses et de séquences (annexes 1 et 2), la première étape de détection et de quantification de ces molécules ne peut être envisagée qu'à partir de l'identification des ions pseudomoléculaires. En milieu acide, la fragmentation des molécules au niveau de la liaison Aib-Pro est fortement favorisée, aboutissant à l'observation d'ions fragments majoritaires. Le milieu neutre, conduisant à la formation préférentielle des ions pseudomoléculaires, sera donc préféré et utilisé dans la suite de cette étude.

En mode positif, les peptaïbols à longue séquence sont principalement détectés sous la forme d'adduits sodium bichargés $[M+2Na]^{2+}$ et monochargés $[M+Na]^+$. L'analyse de solutions d'alaméthicines en mode négatif a été réalisée de manière à étudier les ions négatifs formés par ces molécules et d'évaluer si ce mode était plus favorable à leur détection. La Figure IV.1 montre que les ions pseudomoléculaires $[M-H]^-$ et les adduits chlorure $[M+Cl]^-$ sont préférentiellement observés. Cependant, en comparaison au courant ionique total obtenu en mode positif dans des conditions expérimentales identiques, l'intensité du signal est 100 fois plus faible.

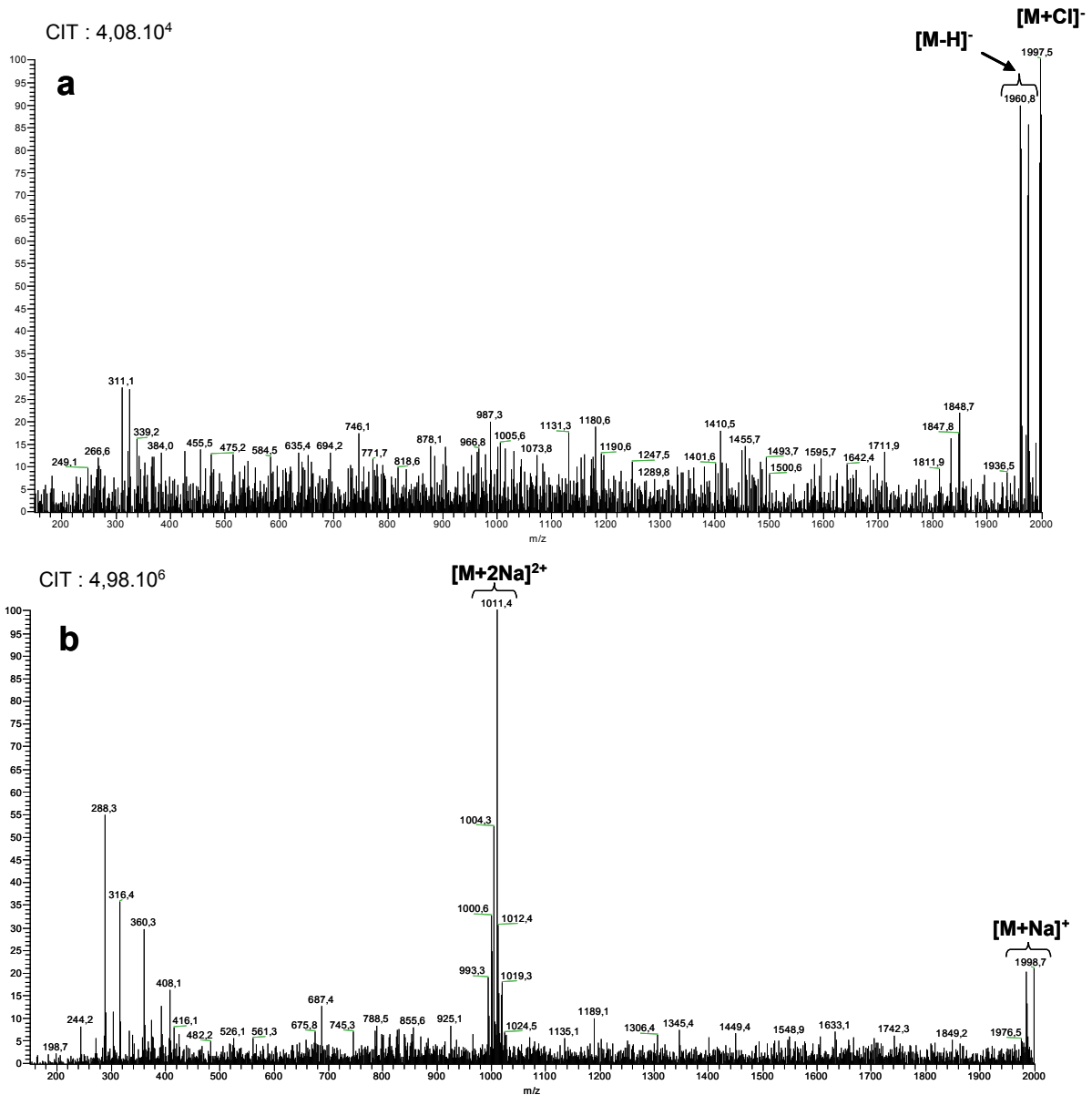


Figure IV.1 : Spectres (courant ionique total) du mélange d'alaméthicines observés en mode de détection (a) des ions négatifs, (b) des ions positifs.

(solvant = méthanol, concentration = 500 ng.mL^{-1} , débit = $3 \text{ } \mu\text{L.min}^{-1}$)

En raison des caractéristiques structurales particulières de leurs extrémités N- et C-terminales, les sites ionisables des peptaïbols sont limités aux groupements carboxyles des résidus Gln et aux groupements amines des résidus tryptophanes lorsqu'ils sont présents. La formation d'ions déprotonés à partir des molécules en solution est donc peu favorable. Le mode de détection des ions positifs, ions préférentiellement formés par les peptaïbols, a donc été choisi pour la suite de cette étude.

IV.2.3. Choix du solvant de solubilisation

Le solvant de solubilisation joue un rôle important dans le processus d'ionisation des molécules par électronébulisation. Les propriétés du solvant influent, en effet, sur les caractéristiques du spray formé. Le potentiel minimum requis pour la formation du cône de Taylor est ainsi dépendant de la tension de surface du solvant utilisé, le courant du spray, de sa conductivité et la taille des gouttelettes formées, de sa viscosité (Cole, 1997 ; Cech et Enke, 2001).

L'état de charge des ions formés en phase gazeuse est également fortement lié à la polarité du solvant utilisé. Ainsi, les solvants les plus polaires, qui permettent une meilleure stabilisation des espèces multi-chargées en solution, favorisent la formation d'ions présentant un nombre élevé de charge en phase gazeuse (Cole et Harrata, 1993 ; Cole, 1997). Ainsi, le signal et la sensibilité augmentent si les ions sont préformés en solution avant leur introduction dans la source, cela ne peut être le cas pour les peptaïbols neutres.

Dans un objectif de quantification d'éléments traces dans l'environnement marin, il était nécessaire d'évaluer l'influence du solvant de solubilisation sur la charge des ions et sur la sensibilité de détection. Le choix de ce solvant était conditionné par différents facteurs : le caractère moyennement polaire des peptaïbols, les contraintes liées à la séparation chromatographique en amont, et au processus d'ionisation par électronébulisation.

Tenant compte de ces différents paramètres, des solutions d'alaméthocines, solubilisées dans quatre solvants ou mélanges de solvants, acétonitrile/eau 75 :25 v/v, acétonitrile 100%, méthanol/eau 75:25 v/v, méthanol 100%, ont été analysées. Les figures IV.2 et IV.3 illustrent l'influence du solvant utilisé sur l'intensité, la nature et la distribution de l'état de charge des ions formés. De façon générale, le mélange méthanol/eau 75 :25 (v/v) et, dans une moindre mesure, le méthanol 100%, favorisent nettement l'ionisation des molécules. Les intensités du signal obtenu avec ces solvants sont en moyenne 3 à 7 fois plus élevées qu'avec le mélange acétonitrile/eau 75:25 (v/v) et 50 à 100 fois plus élevées qu'avec l'acétonitrile 100%. En ce qui concerne la nature des ions formés, les adduits sodiques sont préférentiellement formés dans l'ensemble des cas. L'adduit protoné $[M+H]^+$ est observé en très faible abondance avec l'utilisation des mélanges acétonitrile/eau et méthanol/eau. Ces mélanges semblent de plus favoriser la formation des fragments b_{13} , y_7 et $[y_7+Na]^+$, formés par le clivage de la molécule au niveau de la liaison Aib-Pro. La distribution de l'état de charge des ions est influencée par la polarité du solvant, les ions sodiques trichargés étant formés avec les solvants les

plus polaires. Leur abondance est supérieure à 20% avec l'utilisation du mélange méthanol/eau 75 : 25 (v/v).

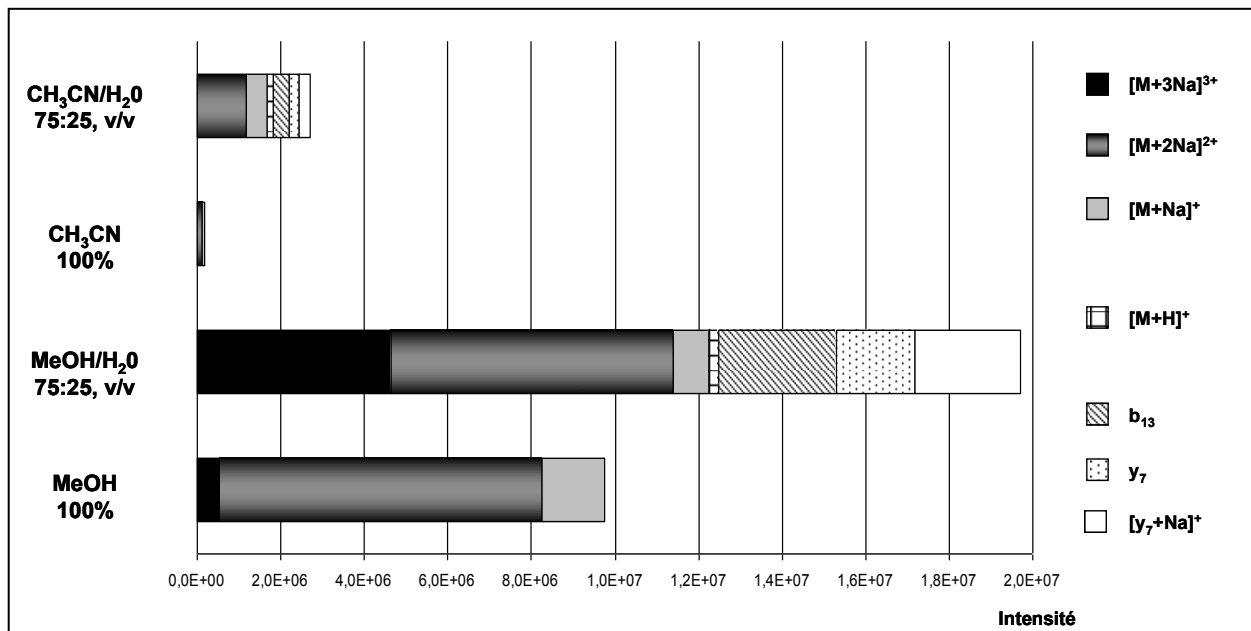


Figure IV.2 : Influence du solvant de solubilisation sur la nature et la distribution de l'état de charge des ions formés en phase gazeuse par l'alaméthicine.

(concentration = 200 ng.mL⁻¹, débit = 3 μL.min⁻¹)

Suite à ces résultats, le méthanol ou le mélange méthanol/eau, favorisant nettement l'ionisation des peptaïbols, ont été choisis pour la poursuite de notre étude et la mise au point des conditions chromatographiques. Le signal des adduits sodiques bichargés, observés de façon prédominante et constante dans ces deux types de solvants, a été optimisé dans l'objectif de la mise au point de l'analyse quantitative. Ces ions présentent l'avantage d'être stables et d'évoluer dans une zone allant de 860 à 1030 *m/z*, située dans la gamme des rapports *m/z* détectée par l'appareil (150 à 2000 *m/z*). Les adduits sodiques monochargés, beaucoup moins abondants, évoluent au contraire dans la zone limite supérieure ou en dehors de cette gamme (1700 à 2030 *m/z*), impliquant la détection d'une seule partie des ions.

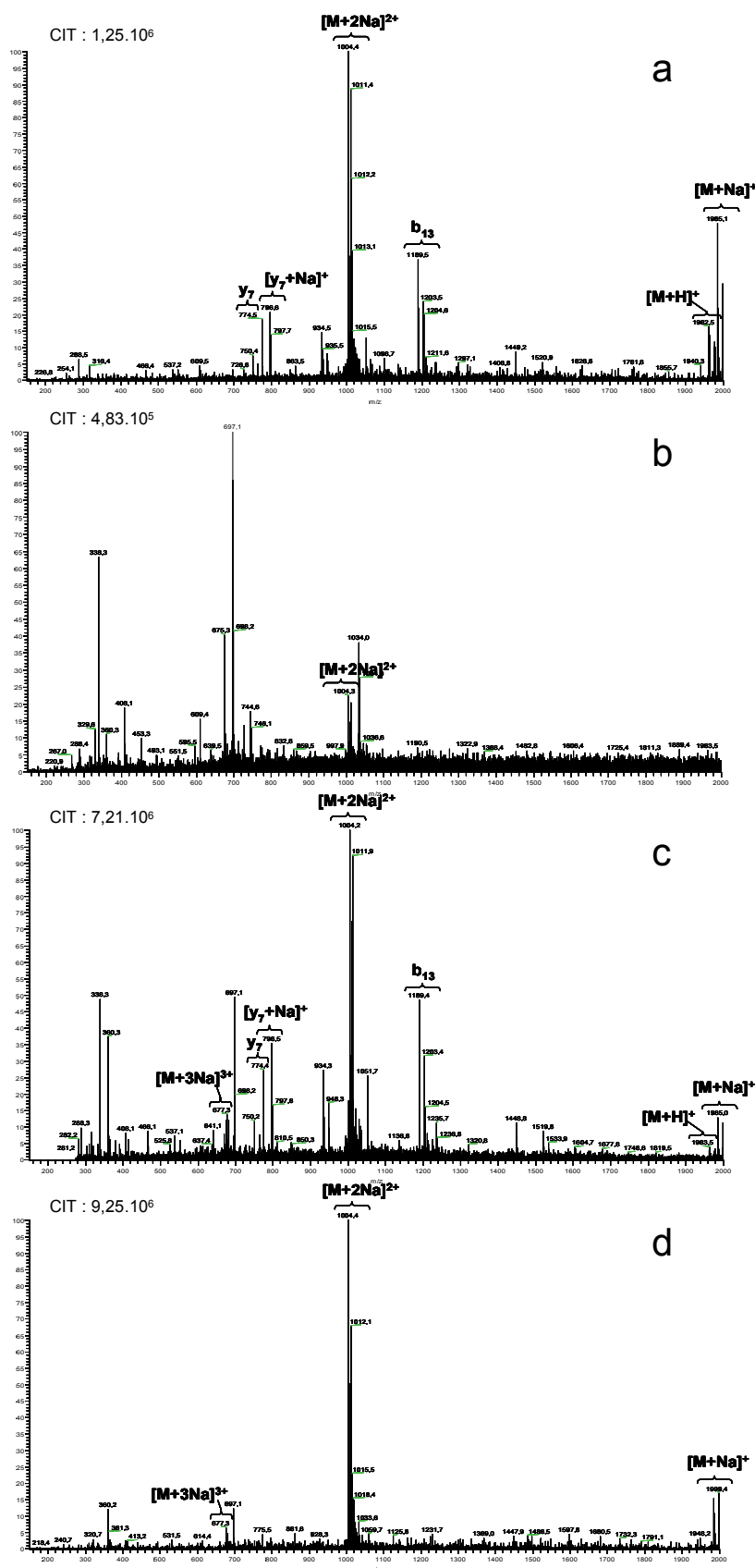


Figure IV.3 : Spectres (courant ionique total) obtenus après perfusion de solutions d'alaméthiécines solubilisées avec : a) un mélange acétonitrile/eau 75 :25 v/v ; b) de l'acétonitrile 100%, c) un mélange méthanol/eau 75 :25 v/v, d) du méthanol 100%.

(concentration = $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, débit = $3 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$)

IV.2.4. Choix du mode d'analyse

Cinq modes d'analyse peuvent être utilisés pour la détection des ions :

- le mode « Full scan » (courant ionique total) : permet la détection de tous les composés et analytes ionisés, présents dans l'échantillon (SM Full Scan). Il peut être également utilisé pour l'analyse des ions fils produits lors de la fragmentation d'un ion parent (SM² Full Scan) et l'analyse des ions petit-fils produits lors de la fragmentation d'un ion fils (SMⁿ Full Scan),

- le mode « SIM » (Selected Ion Monitoring) : permet l'analyse d'un ion d'intérêt après isolement dans la trappe,

- le mode « SRM » (Selected Reaction Monitoring) : permet la détection d'un ou plusieurs ions fils après isolement et fragmentation SM² d'un ion parent,

- le mode « CRM » (Consecutive Reaction Monitoring) : permet la détection d'un ou plusieurs ions petit-fils après isolement et fragmentation successive SMⁿ d'un ion parent et de ces ions fils,

- le mode « Zoomscan » : est un mode « haute résolution » pour lequel les vitesses de balayage des tensions au niveau de la trappe sont diminuées. Ce mode, exécuté sur une gamme restreinte de rapport m/z , permet de déterminer, avec précision, l'état de charge d'un ion et sa masse moléculaire. Ainsi, deux pics consécutifs de l'amas isotopique d'un ion n fois chargé sont distants de $1/n$ u.

Les modes SM²/SMⁿ Full Scan, SIM, SRM et CRM nécessitent de connaître au préalable la masse des ions recherchés. Cependant, plus de 230 molécules appartenant au groupe des peptaïbols à longue séquence ont été décrites jusqu'ici, présentant une diversité importante de structure et de masses moléculaires (Annexe 1). Dans un objectif de détermination de la quantité totale de peptaïbols à longue séquence présents dans des échantillons du milieu naturel, il n'était donc pas possible d'utiliser ces différents modes.

Les modes SM Full Scan et Zoomscan permettent le balayage de gammes plus larges et ont donc été comparés. Le mode Zoomscan permet la détermination du profil isotopique des ions et donc une première discrimination basée sur l'état de charge de l'ion formé et de sa nature peptidique. Son utilisation génère de plus un gain de sensibilité par rapport au mode Full Scan, se traduisant par une augmentation du rapport signal / bruit (Figure IV.4).

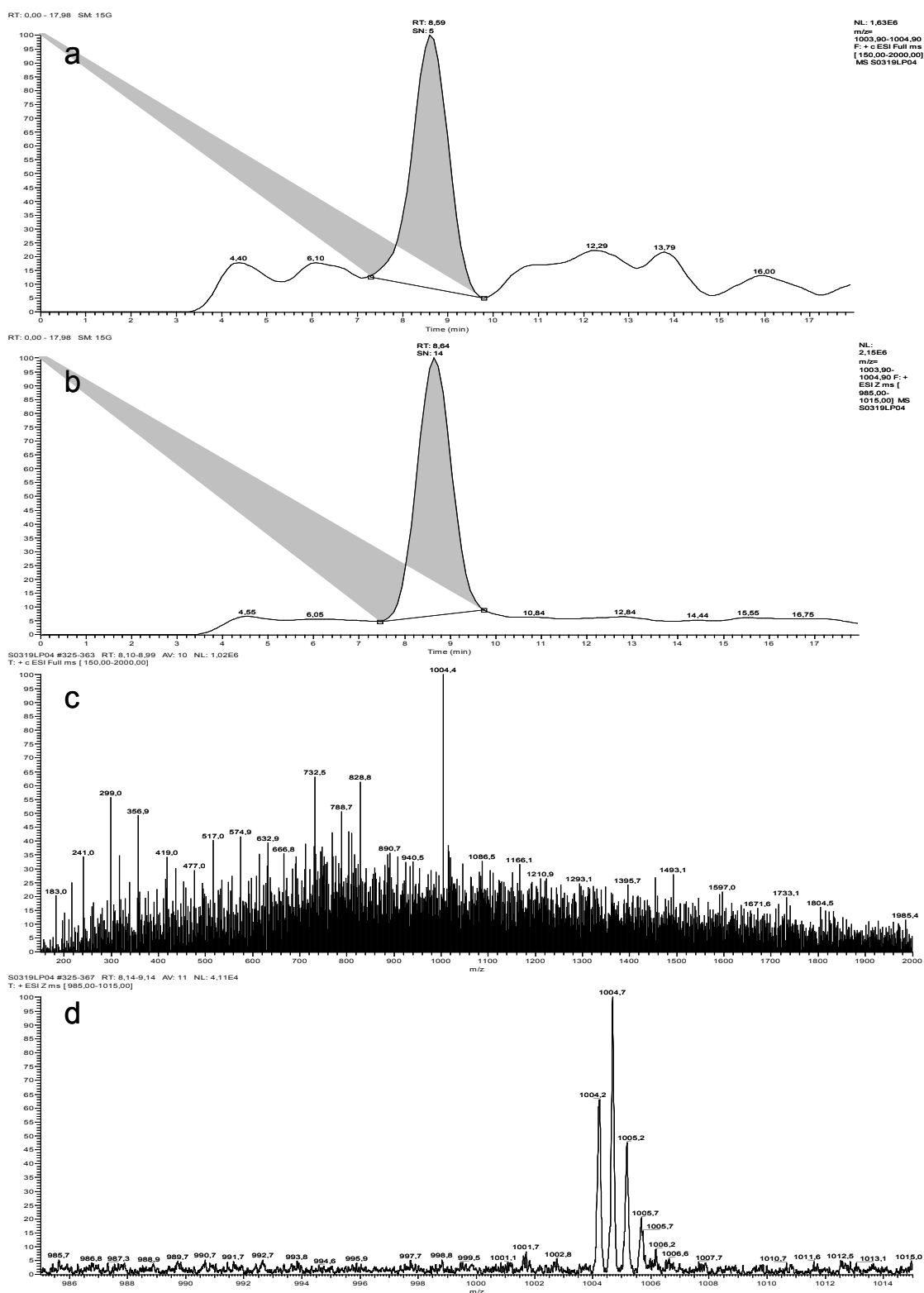


Figure IV.4 : Comparaison des modes SM Full Scan (a, c) et Zoomscan (b, d) pour l'analyse de l'alaméthicine F50/5 par CLHP/SM-ES-TI.

a) et b) chromatogrammes, c) et d) spectres respectifs, correspondants au pic de $t_R = 8,61 \pm 0,03$ min

(Conditions chromatographiques : colonne Kromasil C18, phase mobile = MeOH/H₂O 85 : 15 v/v, débit = 0,2 mL.min⁻¹)

En mode Zoomscan, la résolution diminue lorsque la gamme de masse scannée augmente. Les gammes de rapports m/z balayées sont donc généralement limitées à 10 u. Dans notre étude, le balayage en mode Zoomscan a été conduit sur des fenêtres de 20 à 30 u de manière à détecter le plus de composés possibles. Cette détection s'est focalisée sur des gammes allant de 870 à 890 m/z et de 985 à 1015 m/z , correspondant aux gammes de masse des adduits sodiques bichargés les plus fréquemment rencontrés (Figure IV.5). Le mode SM Full Scan a également été utilisé, en alternance, sur une gamme de 150 à 2000 m/z de manière à avoir une vue générale des ions présents dans l'échantillon. Dans un dernier temps, une analyse supplémentaire, conduite en mode SM² Full Scan sur les adduits sodiques préalablement observés, a permis le séquençage partiel des molécules et leur identification.

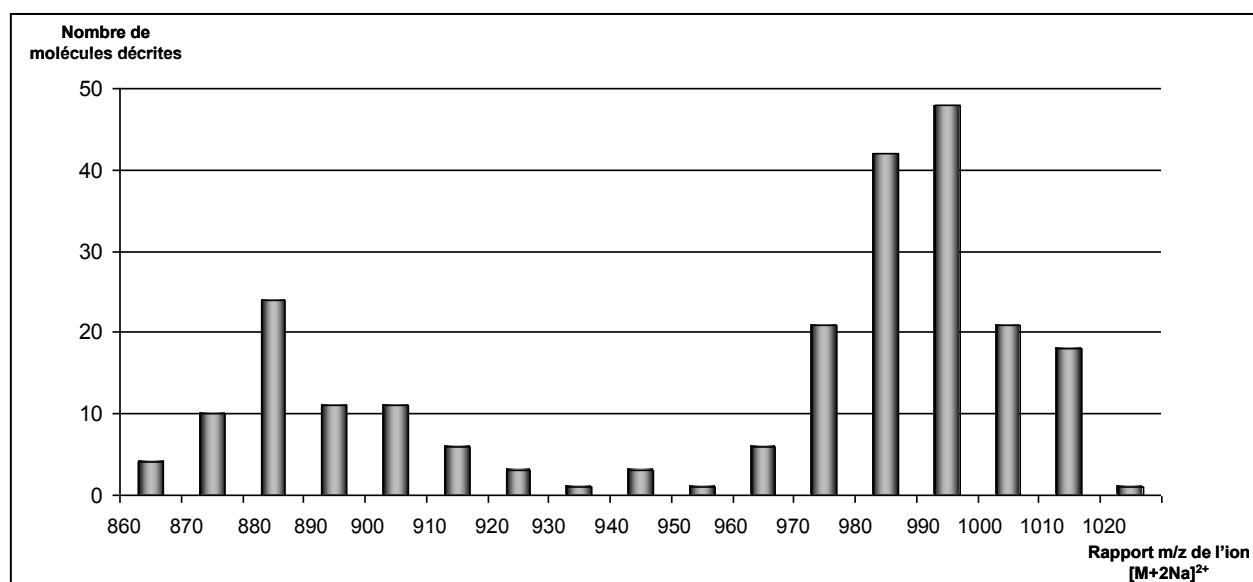


Figure IV.5 : Répartition du nombre de peptaïbols à longue séquence décrits en fonction des rapports m/z de l'adduit sodique bichargé $[M+2Na]^{2+}$ formé par ces molécules.

IV.2.5. Optimisation des paramètres instrumentaux

La sensibilité de la détection des ions dépend finalement de l'optimisation des paramètres de la source d'ionisation, du système de transmission et de la trappe ionique. Les conditions favorisant la formation et la détection des adduits sodium bichargés ont été obtenues par une série d'analyses réalisée en perfusant dans le flux de la phase mobile ($200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) en sortie de colonne, une solution méthanolique d'alaméthazines (concentration = $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) à l'aide d'une seringue ($3 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). Ce montage a permis d'ajuster les paramètres en tenant compte de la nature et du débit de la phase mobile. Après avoir déterminé le rapport m/z de l'ion d'intérêt, les réglages du voltage du spray, du

débit des gaz vecteur et auxiliaire et de la température du capillaire chauffé sont réalisés de manière manuelle. Les voltages du capillaire, de la lentille tubulaire, des octopôles et de la lentille interoctopôle sont ajustés de façon automatique. Les conditions de fragmentation des molécules ont été déterminées par l'ajustement manuel de la fenêtre d'isolement de l'ion parent et par l'optimisation automatique de l'énergie de fragmentation.

Ces optimisations ont été réalisées sur la base du rapport m/z de l'ion bichargé de l'alaméthicine F50/5 (m/z 1004,4) et reconduite au fur et mesure des différentes opérations de maintenance réalisées sur le spectromètre de masse. La Figure IV.6 montre la nature et la distribution de l'état de charge des ions formés après optimisation de ces paramètres. Quelle que soit la proportion d'eau ajouté au méthanol, l'adduit sodique bichargé représente l'ion majoritairement formé. Son signal est significativement augmenté après optimisation. Les conditions optimales de fragmentation SM^2 (fenêtre d'isolement : 1u ; énergie de collision : 32%) ont été déterminées de manière à favoriser l'observation des ions fragments $[a_{13}+Na]^+$ et $[y_7+Na]^+$ correspondant respectivement aux extrémités N- et C-terminales de la molécule.

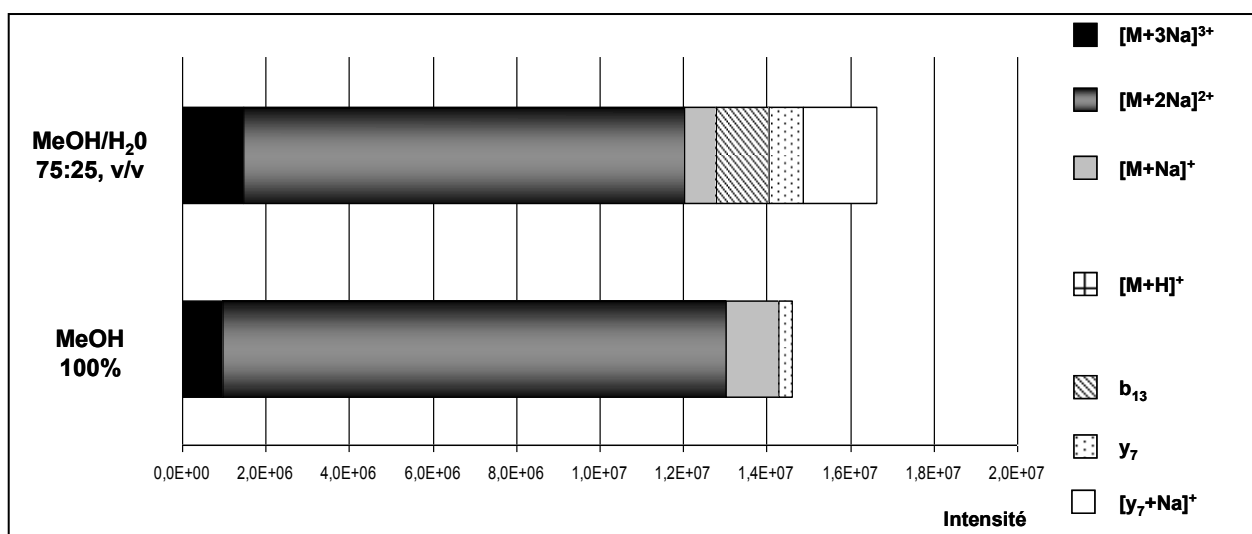


Figure IV.6 : Optimisation du signal de l'adduit sodique bichargé $[M+2Na]^{2+}$ en SM-ES-TI obtenu par perfusion de solutions d'alaméthicines solubilisées dans un mélange méthanol/eau 75 :25 v/v ou du méthanol.

(concentration = 200 ng.mL⁻¹, débit = 3 μ L.min⁻¹)

IV.3. Développement d'une méthode de quantification des peptaïbols dans la matrice sédimentaire

IV.3.1. Introduction

Le développement de la méthode d'analyse quantitative des peptaïbols dans la matrice sédimentaire par CLHP/SM-ES-TI et ses applications ont fait l'objet d'une publication dans *Journal of Chromatography A* (article 2). Les protocoles d'extraction et de purification des peptaïbols à partir des sédiments ont été étudiés et optimisés à l'aide d'expériences de recouvrement de standard. Différentes méthodes de calibration ont été examinées pour la quantification des molécules dans cette matrice.

La méthodologie développée a permis l'analyse quantitative :

- des échantillons de sédiments prélevés en mars 2006 sur le site du Fier d'Ars, précédemment étudiés qualitativement dans le cadre de l'article 1.
- des échantillons de sédiments prélevés de mai à septembre 2004, lors d'épisodes importants de mortalités, sur trois sites ateliers du programme Morest : Marennes Oléron, Baie des Veys et Auray.

Le programme « Morest », débuté en 2001 et poursuivi sur une durée de quatre ans, visait à comprendre les causes et les mécanismes de la mortalité estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, observée sur le littoral français depuis plusieurs années. Ces épisodes de mortalités anormales se manifestent au printemps et en été, essentiellement sur les juvéniles. Ce programme, coordonné par Ifremer, a consisté en une approche multidisciplinaire, associant les équipes d'une quinzaine de laboratoires de huit organismes de recherche nationaux, les structures techniques conchyliques régionales ainsi que les professionnels (éleveurs et écloveurs-nurseurs). Des sites-ateliers instrumentés ont permis les suivis en continu des paramètres du milieu et les performances de survie et de croissance du naissain.

La baie des Veys est une baie largement ouverte sur le littoral, située sur les côtes de la Manche orientale (Normandie). Cette baie est connue pour ses capacités conchyliques, ses gisements de coques et son avifaune hivernante et de passage (Figure IV.7).

L'estuaire de la rivière d'Auray est situé sur la côte méridionale du Morbihan et est dominé dans sa partie aval par une importante activité ostréicole.

Le bassin de Marennes Oléron est une baie macrotidale de 150 km², située au milieu de la façade atlantique française et qui constitue le premier domaine ostréicole en Europe. L'île d'Oléron protège ce bassin de l'influence directe de l'océan Atlantique.

Au regard des propriétés toxicologiques des peptaïbols et de leur mise en évidence dans des zones conchylicoles, il était intéressant d'évaluer leur présence dans les sédiments prélevés dans ces différents sites. La recherche des micromycètes présents dans ces échantillons n'a cependant pas pu être effectuée, l'échantillonnage n'ayant pas été accompli dans les conditions de stérilité nécessaires à la réalisation de cet objectif.

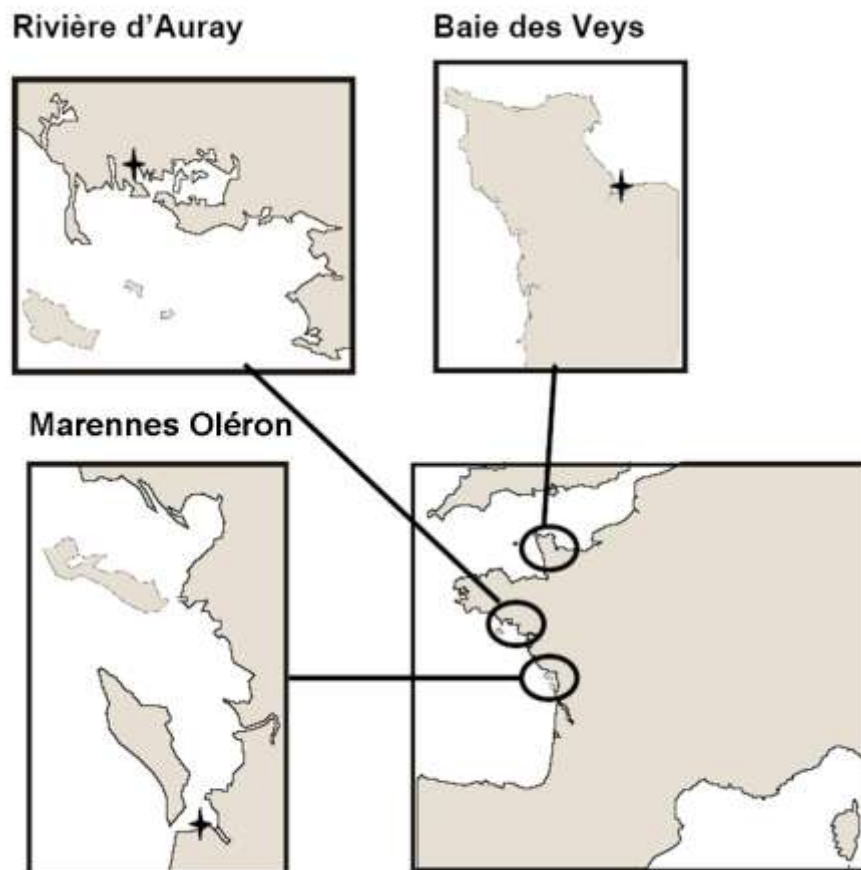


Figure IV.7: Carte de localisation des trois sites ateliers du programme Morest : la baie des Veys, la rivière d'Auray et le bassin de Marennes Oléron.

IV.3.2. Article 2

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal of Chromatography A, 1160 (2007) 106–113

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY Awww.elsevier.com/locate/chroma

Determination of peptaibol trace amounts in marine sediments by liquid chromatography/electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry

Laurence Poirier^{a,*}, Jean-Claude Amiard^a, Florence Mondeguer^b, Françoise Quiniou^c,
Nicolas Ruiz^a, Yves François Pouchus^a, Monique Montagu^a

^a Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, SMAB, EA2160, Faculté de pharmacie, 1 rue G. Veil – BP 53508, Nantes F-44000, France

^b IFREMER-DEL/PN, Centre de Nantes, 1 Rue de l'Île d'Yeu Nantes - BP 21105, 44311 Nantes Cedex 3, France

^c IFREMER-BE/EX, Centre de Brest – BP 70, 29280 Plouzané, France

Received 27 December 2006; received in revised form 2 April 2007; accepted 5 April 2007

Available online 12 April 2007

Abstract

Extraction followed by reverse phase liquid chromatography (LC)/electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry (ESI-IT-MS) analysis has been successfully developed for the determination of peptaibols, fungal toxic metabolites, in marine sediments. Spiking experiments showed that the mean recovery of target compounds exceeded 85% at a spiking level of 10 ng/g of sediment (wet weight). Detection and quantification limits were 250 and 830 pg/g of sediment, respectively. The method developed constituted the first sensitive assay for quantification of peptaibol trace amounts in a natural environment. A concentration of 5 ng/g in sediment samples collected from Fier d'Arts was found.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Fungal peptide metabolites; *Trichoderma* sp.; Marine fungal contamination; Electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry (ESI-IT-MS); Matrix matched calibration

1. Introduction

Fungal production of mycotoxins in the marine environment is proposed as a possible cause for episodes of unexplained toxicity observed in shellfish populations during the last decade. Within this framework, numerous strains of toxigenic saprophytic fungi were isolated from shellfish, sediment and seawater samples collected in shellfish farming areas [1]. Among them, different strains of *Trichoderma* sp., grown in marine-like culture conditions, produced peptaibols, peptidic metabolites, which are toxic for different larval models (diptera or crustacean larvae) [2].

Peptaibols constitute a constantly growing family of linear peptide antibiotics of fungal origin. They are characterized by a molecular mass from 500 to 2200 u, an acetyled N-terminus, a C-terminus amino alcohol and a high content of a non proteinogenic amino acid, α -aminoisobutyric acid (Aib or U) [3]. Peptaibols are exclusively produced by filamentous fungi

mainly belonging to the genera *Trichoderma*, *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Emericellopsis* and *Gliocladium*. They have been classified into subfamilies according to their amino acid chain lengths (ranging from 5 to 20 residues) and their chemical characteristics [4]. These fungal metabolites exhibit a variety of biological activities resulting from their membrane-modifying and pore-forming properties. Thus antibacterial, antifungal and occasionally antiviral and antiparasitic activities have been reported [5–8].

A previous experimental contamination has shown that peptaibols can be accumulated in filter-feeder molluscs (*Mytilus edulis*) when present in sea-water as soluble compounds [9]. The presence of such compounds in the marine environment could lead to health risks for shellfish and their consumers. Different peptaibols were recently detected in sediments in a marine area devoted to shellfish farming (Fier d'Arts, Atlantic coast, France) [10]. These sediment samples displayed high toxicity for mussel larvae in the absence of significant contaminations (metals, PCBs, HAPs, pesticides, antibiotics) or eutrophication [11]. Developing analytical methods allowing the precise determination of these fungal metabolites in the marine environment is therefore of great interest in order to establish a causal

* Corresponding author. Tel.: +33 251 12 57 52.

E-mail address: laurence.poirier@univ-nantes.fr (L. Poirier).

relationship between peptaibol concentrations and biological effects. Certain methods, that use radioactivity or capillary electrophoresis coupled with UV and ESI-TOF-MS, have already been described for the quantification of peptaibols isolated from fungal cultures [12,13]. However, they are not sensitive enough for determining trace amounts. The aim of this work is to develop a process for extracting peptaibols from marine sediment matrices and a sensitive assay for the determination of trace amounts by using LC/ESI-IT-MS. The method developed focuses on long-sequence peptaibols, including 18–20 amino acid residues, because of their high bioactivity [6] and their predominance in peptaibol family [14].

2. Experimental

2.1. Chemicals

Methanol and dichloromethane were purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France) and distilled before use. Ethanol was purchased from APC (Aubervilliers, France). Trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Fluka Chemical (Buchs, Switzerland), hydrochloric acid from Acros organics (Geel, Belgium) and acetic acid from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). For mass spectrometry analysis, HPLC-grade methanol was obtained from Baker (Deventer, Holland). Water was purified to HPLC-grade quality with a Millipore-Q RG ultrapure water system from Millipore (Milford, CT, USA). Alamethicin F50 was obtained from Sigma–Aldrich (Ref. A4665).

2.2. Sediment samples

Sediment samples used for optimizing extraction and purification procedures were collected from La Rochelle (France) in January 2000. They were transported from the site to the laboratory in isothermic containers and frozen at -20°C .

Sediment samples used to estimate environmental contamination were collected from different sites on the French Atlantic coast. Surface sediment samples (oxic fraction, 1st cm) were collected from four sites: the Bay of Marennes-Oléron ($45^{\circ}55'N1^{\circ}13'W$), Auray River ($47^{\circ}38'N2^{\circ}58'W$) and the Bay of Veys ($49^{\circ}22'N1^{\circ}08'W$) in June 2004 (in the framework of the French program "MOREST"), and from Fier d' Ars (Ré Island $-46^{\circ}13'N1^{\circ}29'W$) in March 2006. All the samples were transported from the site to the laboratory in isothermic containers and frozen at -20°C until analysis. Each sample (approximately 10 g wet weight) was subjected to extraction, purification and LC/ESI-IT-MS analysis.

2.3. Optimization of the extraction procedure

The efficiency of the extraction procedure was checked by recovery experiments. The nature of the extraction solvents was the decisive parameter for which optimization was required. Approximately 10 g wet weight (ww) of sediments were spiked with 100 ng of alamethicin F50 and extracted with 3×25 mL of different organic solvents. According to the preliminary experiments, five different mixtures of solvents were selected for

definitive tests: (a) dichloromethane/methanol (1:1, v/v); (b) methanol/TFA 0.1% (v/v); (c) ethanol/acetic acid 1% (v/v); (d) acetone/acetic acid 1% (v/v); and (e) acetone/hydrochloric acid 0.02% (v/v). At each extraction step, the sample was sonicated for 15 min and centrifuged at $700 \times g$ for 5 min. Two procedures were used in order to eliminate salts. The supernatants obtained with mixtures (a), (b) and (c) were evaporated to dryness and redissolved in 50 mL of dichloromethane/methanol/water (2:2:1). The aqueous phase containing salts was washed twice with dichloromethane. The organic phases were then combined and evaporated to dryness. The supernatants obtained with solvent mixtures (d) and (e) were simply filtered and evaporated to dryness (crude extracts).

2.4. Purification of extracts

Purification of crude extracts was performed by vacuum liquid chromatography (VLC) on a diol-silica gel column (10 mm \times 40 mm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The column was prepared with 2 g of sorbent and rinsed with 10 mL of dichloromethane prior to sample loading. For this step, two deposit modes were investigated. In Mode 1, the extract was redissolved and deposited with 3 mL of three successive solvent mixtures in the purification column: dichloromethane/ethanol (100:0, 90:10 and 50:50, v/v). Mode 2 corresponded to a dry deposit. The crude extract was dissolved in 10 mL of dichloromethane/ethanol mixture (50:50, v/v) and mixed with a quarter of the sorbent phase. This mixture was evaporated to dryness and loaded in the column. Elution was performed with 40 mL of successive dichloromethane/ethanol mixtures (100:0, 98:2, 90:10 and 50:50, v/v). The fractions obtained (A, B, C and D, respectively) were evaporated to dryness and redissolved in methanol (500 μL) prior to analysis by using the hyphenated LC/MS technique.

2.5. LC/MS analysis

The samples were analyzed on a modular HPLC system consisting of a Spectrophysics Spectra System P2000 pump, an AS 100XR autosampler (Thermo Separation Products, San Jose, CA, USA) equipped with a Kromasil C-18 5- μm reverse-phase 2.0 mm \times 250 mm column (Interchim, Montluçon, France) heated to 40°C and coupled with a Finnigan Matt LCQTM ESI-IT-mass spectrometer (Thermo Separation Products). The mobile phase consisted of a methanol/ H_2O (85:15, v/v) mixture delivered at a constant flow rate of 0.2 mL/min (isocratic mode). The sample injection volume was 5 μL . All mass analyses were performed in positive mode. To ensure optimal detection, perfusion of a methanolic solution of alamethicin F50 (50 ng/mL) into the flow of LC using a micrometrically automated 250- μL syringe (Hamilton, Reno, NV, USA) at a flow rate of 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ was performed to optimize the mass spectrometer parameters. The spray voltage was set to 4.50 kV, the capillary temperature to 266°C and the capillary voltage to 42 V. Nitrogen flow rates were 89 and 37 (arbitrary units), respectively, for sheath and auxiliary gas. The parameters of ion optic transmission were adjusted to 55 V for Tube Lens Offset, -3.50 V for Multipole 1

Offset, –6 V for Multipole 2 Offset and 400 V for Multipole RF Amplifier (peak to peak).

MSⁿ spectra acquisitions were carried out with a collision energy of 32% and an isolation width of 1 u.

All spectra acquisitions and reworks were done using LCQ Xcalibur 1.3 software (Thermo Fisher Scientific).

2.6. Calibration and quantification

External and matrix matched calibrations were compared. A commercial solution of alamethicin F50 was used as external standard and characterized by LC/MSⁿ analysis. This product contains four individual components which have been identified as alamethicin F50/5, F50/6a, F50/7 and F50/8b with molecular masses of 1962, 1976, 1976 and 1990 u, respectively, according to Kirschbaum et al. [15].

The two main components, alamethicin F50/5 (*m/z* 1004.3, *t_R* 8.8 min) and F50/7 (*m/z* 1011.3, *t_R* 10.6 min), which represented a constant proportion of 90.5% in the reference solution, were used for the calibration performed by using LC/ESI-IT-MS. This proportion remained constant after the extraction and purification steps. For external standardization, a calibration curve was prepared using 8 concentrations of alamethicin F50 in methanolic solution (1–100 µg/L). To consider the matrix effects, matrix matched calibration samples were prepared by adding different concentrations of alamethicin F50 to sediment extracts obtained after purification. 100 µL of alamethicin F50 reference solution at 12.5, 25, 50, 100 and 200 µg/L were added to 100 µL of each purified fraction C and D. LC/MS analysis of each concentration level was performed 6 times for both external and matrix matched calibrations. The accuracy and precision of the matrix matched calibration method were calculated for each concentration level.

The accuracy of the method developed was determined by the analysis of three sediment samples spiked with 100 ng of alamethicin F50 solution. All the percentages of recovery were determined relative to the standard samples.

2.7. Statistical treatment

Mann-Whitney *U*-tests were carried out to compare the percentages of recovery of alamethicin F50 and impurity masses obtained during the optimization of the extraction and purification steps. Pearson's correlation was used to test the linearity of the quantification data.

3. Results and discussion

3.1. Selection of extraction conditions of peptaibols from sediments

To achieve the efficient extraction of the target compounds, recovery experiments with alamethicin F50 spiked sediments were carried out. Five solvent mixtures were evaluated and the results are shown in Table 1. Extraction using mixtures of dichloromethane/methanol, methanol/TFA and ethanol/acetic acid did not provide satisfactory recovery of alamethicin F50,

Table 1

Influence of the solvent mixture on alamethicin F50 extraction from sediments spiked at 10 ng/g

Tested solvents	Mean recovery (%) ± SD (n = 3)
(a) Dichloromethane/methanol (1:1, v/v)	8.7 ± 0.0
(b) Methanol/TFA (0.1%, v/v)	1.9 ± 0.0
(c) Ethanol/acetic acid (1%, v/v)	5.8 ± 0.0
(d) Acetone/acetic acid (1%, v/v)	86 ± 20
(e) Acetone/hydrochloric acid (0.02%, v/v)	64 ± 9.0

since the values were below 10%. Methanol was generally used in the extraction procedures of peptaibols from fungal cultures (qualitative analysis) [16,17]. In spite of its high elutropic strength, this solvent was not strong enough to remove peptaibols from a complex sedimentary matrix. Acetone/hydrochloric acid mixture (e) provided a higher recovery of alamethicin F50 with a mean of 64 ± 9%. Satisfactory extraction efficiency (86 ± 20%) was obtained using acetone/acetic acid mixture (d) (significant differences with (a), (b) and (c) at the 95% level). An additional extraction test was performed with acetone 100% and resulting in 47% recovery (results not shown), a value lower than those obtained for acidified acetone mixtures. Acid conditions were essential for the extraction of molecules of interest from sedimentary particles. The acetone/acetic acid 1% (v/v) mixture was therefore chosen as the best solvent for further studies.

3.2. Purification of analytes

The crude extracts thus obtained contained a high level of impurities. Hence, it was essential to proceed to further purification steps on extracts to minimize chromatographic interferences and ions suppression. Silica [5,18] and diol-silica gel columns [2,19] were generally used to purify the peptaibols (fungal cultures). In this study, the sediment extracts were purified on diol-silica gel and alamethicin F50 was eluted by fractions C and D (dichloromethane/ethanol 90:10 and 50:50 v/v, respectively). Because of partial dissolution of the extract in dichloromethane, it was necessary to optimize the deposit mode. Thus, two different procedures were tested: Mode 1 – solubilization of the extract in three successive solvent mixtures; Mode 2 – dry deposit.

The recovery of alamethicin F50 was not significantly different depending on Modes 1 and 2 as shown in Fig. 1a (Mann-Whitney, *p*-value = 0.042). However, there were significantly fewer impurities eluted when using Mode 2 than when eluted with Mode 1, as shown in Fig. 1b (Mann-Whitney, *p*-value = 0.05). Moreover, repeatability was better with Mode 2 than with Mode 1. The dry deposit mode (Mode 2) was therefore chosen for the purification of sediment extracts because of less interference from impurities and better repeatability.

3.3. LC/MS identification of peptaibols

Analysed under neutral conditions and positive mode by ESI-IT-MS, long-sequence peptaibols mainly appeared as doubly charged sodium adduct ions [M + 2Na]²⁺ with a peptidic iso-

L. Poirier et al. / J. Chromatogr. A 1160 (2007) 106–113

109

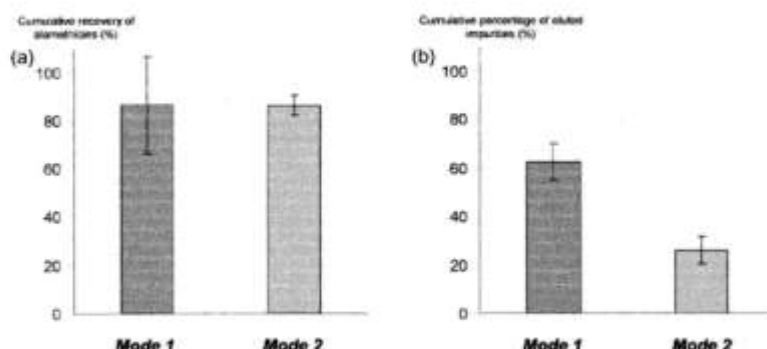


Fig. 1. Influence of the purification mode of crude extracts. Mode 1: extract deposited with three successive fractions: dichloromethane/ethanol 100:0, 90:10 and 50:50 (v/v); Mode 2: dry deposit. (a) Cumulative recovery of alamethicin F50. (b) Cumulative percentage of eluted impurities.

topic profile (Fig. 2a). In LC/MS, their detection was performed through three scan events repeated throughout the chromatographic separation: a total current ion scan (fullscan) from m/z 150–2000 and two enhanced resolution scans (zoomscan) from

m/z 870–890 and from m/z 985–1015. An additional analysis in MS² mode was performed during a second run on the sodium adduct ions observed previously. This generated a spectrum containing mainly the a_n and y_n ion series as classically reported

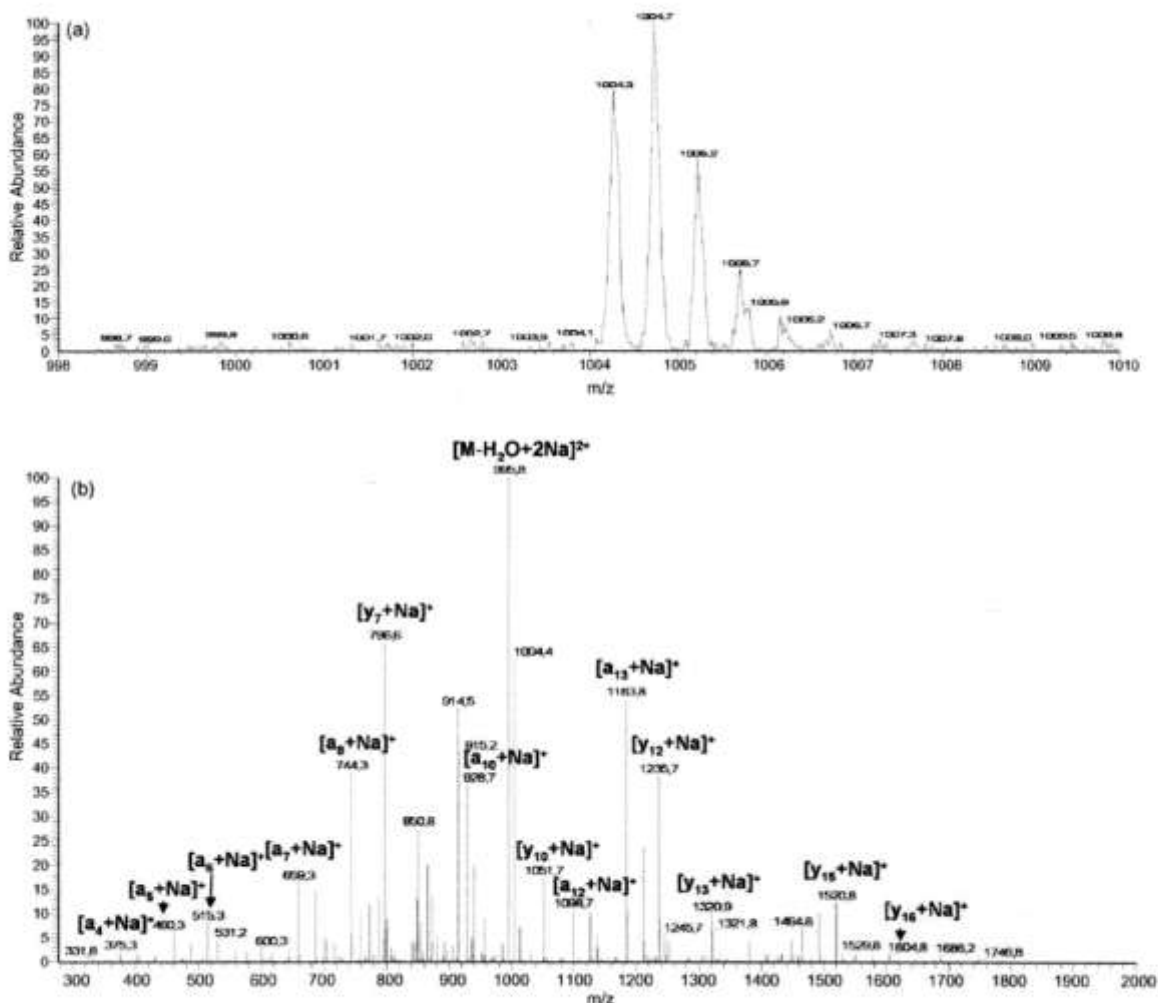


Fig. 2. Mass spectra of alamethicin F50/5: (a) Zoomscan mode; (b) MS² spectrum of ion at m/z 1004.3 [M+2Na]²⁺. The main fragments corresponding to a_n and y_n ion series are shown.

110

L. Poirier et al. / J. Chromatogr. A 1160 (2007) 106–113

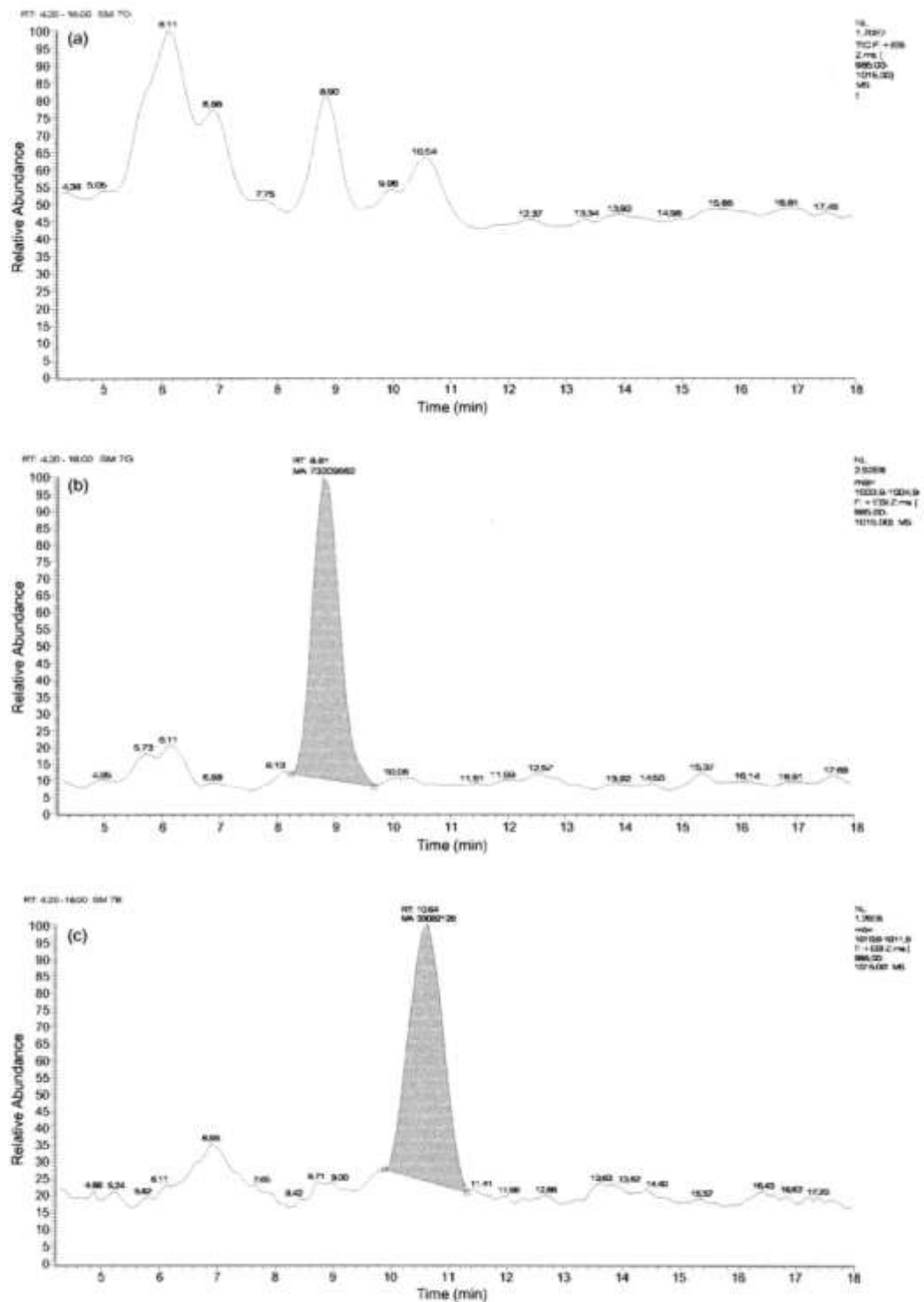


Fig. 3. LC/ESI-IT-MS analysis of surface sediment samples collected from Fiers d'Arz — chromatograms of fraction D spiked with alamethicin F50 reference solution (25 µg/L): (a) total ion current; (b) detection on the range [1003.9–1004.9]: peak of alamethicin F50/5; (c) detection on the range [1010.9–1011.9]: peak of alamethicin F50/7.

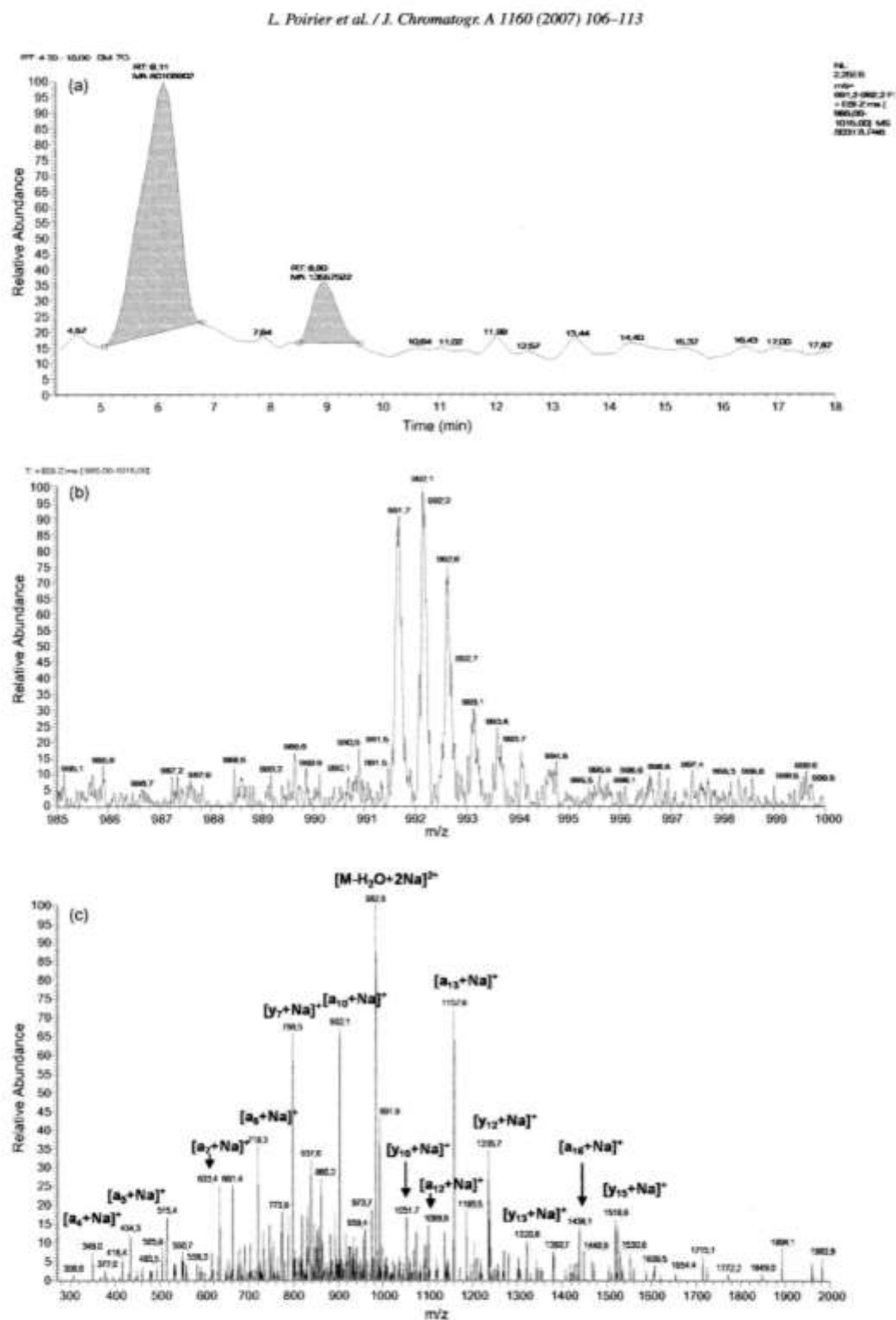


Fig. 4. LC/ESI-IT-MS analysis of surface sediment samples collected from Fiers d'Arx: (a) chromatogram (detection on the range [991.2–992.2]); (b) mass spectrum corresponding to peak at $t_R = 6.11$ min; (c) MS² spectrum of ion at m/z 991.7 $[M+2Na]^{2+}$. The main fragments corresponding to a_n and y_n ion series are shown.

by others authors [20], while b_n ions, predominant in the acid medium, were also detectable but in lower abundance [21,22]. Peptide identification was based on the production of N- and C-termini fragments resulting from preferential breaking of the Aib-Pro bond [23–25]. MS² analysis of m/z 1004.3 (alamethicin F50/5) is depicted in Fig. 2b which shows a predominant doubly charged ion $[M - H_2O + 2Na]^{2+}$ at m/z 995.8 corresponding to a loss of a water molecule on the amino alcohol located at the C-terminus. The N-terminus $[a_{13} + Na]^+$ at m/z 1183.8 and the C-terminus $[\gamma_7 + Na]^+$ at m/z 796.6 could be easily identified. An Aib residue can be visualized between fragments $[a_{12} + Na]^+$ at m/z 1098.7 and $[a_{13} + Na]^+$ at m/z 1183.8.

3.4. LC/MS quantification of peptaibols

External and matrix matched calibrations were compared for peptaibol quantification. To investigate the matrix effect, matrix matched calibration was performed using sediment extracts spiked with the alamethicin F50 reference solution after purification (e.g. for fraction D, Fig. 3a, b and c). Both external and matrix matched calibration curves, obtained by summing the peak areas of the two alamethicin components F50/5 and F50/7, were observed to be linear up to a concentration of 100 µg/L with correlation coefficients higher than 0.98. The comparison of matrix matched calibrations performed with sediments from different origins (La Rochelle and Fiers d'Ars) showed a significant and variable matrix effect with a signal decrease varying from 20 to 52% compared to the signal of alamethicin F50 in methanolic solution. Matrix matched calibration requires at least two LC/MS runs per analysis: one for the sample extract and one for the sample extract spiked with a known quantity of the reference peptaibol. However, it permitted the correction of signal quenching and taking into account the variability of sedimentary matrices.

The analytical method was validated considering the linear range, limit of detection (LOD) and precision. The limit of quantification (LOQ) was determined using the method of Vial and Jardy [26] with a pre-established value of area relative standard deviation (RSD) of 10%. For the reference peptaibol in methanolic solutions, LOD and LOQ were, respectively, 0.5 and 1.7 µg/L. For matrix matched calibration samples, the signal intensity of alamethicin F50 was decreased by coeluted substances originating from the sediments. Consequently, LOD and LOQ were increased, reaching respectively 2.5 and 8.3 µg/L, corresponding to a detection of 250 pg/g and a quantification of 830 pg/g of sediment (ww).

Intra-day statistics of accuracy and precision were determined for matrix matched calibration method (Table 2). The accuracy, expressed in terms of bias (deviation from true values) was between 29% for the lowest concentration (below LOQ), and 2% for a concentration of 9.4 ng/g of sediment. The precision, given by relative standard deviations, was from 10% for a concentration of 0.6 ng/g to 2% for a concentration of 9.4 ng/g.

The whole procedure, from sample treatment to instrumental quantification, provided a satisfactorily accurate result with a recovery of 86 ± 4% determined using spiked sediment samples at a concentration of 10 ng/g (Fig. 1a).

Table 2

Matrix matched calibration: repeatability and accuracy

Alamethicin theoretical (ng/g of sediment)	Mean (ng/g of sediment) ± SD (n=6)	RSD (%)	Bias (%)
0.6	0.8 ± 0.1	10	29
1.2	1.1 ± 0.1	7	-8
2.3	2.2 ± 0.2	9	-4
4.7	3.8 ± 0.2	4	-18
9.4	9.5 ± 0.2	2	2

Table 3

Spectral and chromatographic characteristics of peptaibols observed in surface sediment samples from Fier d'Ars

Observed ions $[M + 2Na]^{2+}$ (m/z)	Calculated M (u)	t_R (min)
991.2	1936.4	8.90
991.7	1937.4	6.11
998.2	1950.4	10.06
998.7	1951.4	6.98

3.5. Application to environmental samples

The method developed (acetone/acetic acid extraction; dry deposit; LC/MS analysis using three scan events; matrix matched calibration) was applied to natural sediment samples collected from different sites along the French Atlantic coast. Long-sequence peptaibols were identified and quantified in samples collected from Fier d'Ars but they were not observed in sediment samples collected from the Bay of Marennes-Oléron, Auray River and the Bay of Veys.

In the Fier d'Ars samples, after chromatographic separation, four doubly charged ions with a peptidic isotopic profile were observed at m/z 991.2, 991.7, 998.2 and 998.7 (e.g. for m/z 991.7, Fig. 4a and b). The molecular masses and retention times of these compounds are shown in Table 3. To confirm their peptaibolic nature, MS² fragmentation was carried out. Fragmentation profiles were obtained for the two main ions m/z 991.7 and 998.7 and were similar in both cases to the fragmentation pattern of long-sequence peptaibols (e.g. for m/z 991.7, Fig. 4c). An identical N-terminus fragment at m/z 1163.8 was identified for these two peptaibols. Two different C-termini parts were observed, respectively, at m/z 773.5 and 787.5. Peptides with molecular masses of 1937.4 and 1951.4 u and showing these N- and C-termini fragments showed numerous similarities with longibrachins and trichokonins, 20-residue peptaibols isolated from *Trichoderma* species [27–31]. The quantification of peptaibols observed in Fier d'Ars samples allowed establishing a concentration of 5.2 ± 2.1 ng/g of sediment (ww) (n = 2).

4. Conclusion

The method described using LC/ESI-IT-MS allows both the identification of peptaibols and, for the first time, their quantification in the pg/g range in complex matrices. LOD and LOQ were, respectively, 250 and 830 pg/g in marine sediments. Several sediment samples were analysed to evaluate the envi-

ronmental contamination and the possible implication of these fungal metabolites in toxicity episodes observed in populations of bivalves along the Atlantic coast. The presence of long-sequence peptaibols was shown in sediments collected from Fier d'Ars and trace amounts were determined in these samples. The adaptation of this analytical method to shellfish matrices is under consideration. Further investigations will permit studying the relationship between environmental concentrations and the toxicity of these compounds for marine organisms.

Acknowledgements

Samples from the Bay of Marennes-Oléron, Auray River and the Bay of Veys were collected in the framework of the French program "MOREST" coordinated by IFREMER. We would like to express our thanks to C. Robiou du Pont, N. Berthet and M. Le Goff for their technical participation.

References

- [1] C. Sallenave-Namont, Y.F. Pouchus, T. Robiou du Pont, P. Lassus, J.F. Verbist, *Mycopathologia* 149 (2000) 21.
- [2] A. Landreau, Y.F. Pouchus, J.F. Biard, C. Sallenave-Namont, T. Robiou du Pont, J.F. Verbist, *J. Microbiol. Methods* 48 (2002) 181.
- [3] T. Degenkolb, A. Berg, W. Gams, B. Schlegel, U. Gräfe, *J. Pept. Sci.* 9 (2003) 666.
- [4] J.K. Chugh, B.A. Wallace, *Biochem. Soc. Trans.* 29 (2001) 565.
- [5] S. Oh, B. Yun, S. Lee, J. Kim, I. Yoo, *J. Antibiot.* 55 (2002) 557.
- [6] S. Rebuffat, C. Goulard, B. Bodo, M.F. Roquebert, *Recent Res. Devel. Org. Bioorg. Chem.* 3 (1999) 65.
- [7] B.S. Yun, I.D. Yoo, Y.H. Kim, Y.S. Kim, S.J. Lee, K.S. Kim, W.H. Yoo, *Tetrahedron Lett.* 41 (2000) 1429.
- [8] M. Schiell, J. Hofmann, M. Kurz, F.R. Schmidt, L. Vértésy, M. Vogel, J. Wink, G. Seibert, *J. Antibiot.* 54 (2001) 220.
- [9] C. Sallenave-Namont, Y.F. Pouchus, M. Bardouil, P. Lassus, M.F. Roquebert, J.F. Verbist, *Toxicol.* 37 (1999) 77.
- [10] L. Poirier, M. Montagu, A. Landreau, M. Mohammed-Benkada, O. Grovel, C. Sallenave-Namont, J. Biard, C. Amiard-Triquet, J.C. Amiard, Y.F. Pouchus, *Chem. Biodivers.* (in press).
- [11] C. Amiard-Triquet, O. Geffard, A. Geffard, H. Budzinski, J.C. Amiard, D. Fichet, H. Pouliquen, Y. Berthelot, E. His, in: H. Tremblay, J. Locat, R. Galvez-Cloutier (Eds.), *Contaminated Sediments: Characterization, Evaluation, Mitigation/Restoration*, Univ. Laval, Québec, 2003, p. 349.
- [12] M. Schirmbock, M. Lorito, Y.L. Wang, C.K. Hayes, I. Arisan-Atac, F. Scala, G.E. Harman, C.P. Kubicek, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 4364.
- [13] A. Psurek, C. Neustl, T. Degenkolb, H. Brückner, E. Balaguer, D. Imhof, G.K.E. Scriba, *J. Pept. Sci.* 12 (2006) 279.
- [14] A. Szekeres, B. Leitgeb, L. Kredics, Z. Antal, L. Hatvani, L. Manczinger, C. Vagvolgyi, *Acta Microbiol. Immunol.* 52 (2005) 137.
- [15] J. Kirschbaum, C. Krause, R.K. Winzheimer, H. Brückner, *J. Pept. Sci.* 9 (2003) 799.
- [16] J. Peltola, A. Ritieni, R. Mikkola, P.A. Grigoriev, G. Pocsfalvi, M.A. Andersson, M.S. Salkinoja-Salonen, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 4996.
- [17] A. Iida, M. Sanekata, T. Fujita, H. Tanaka, A. Enoky, G. Fuse, M. Kanai, P. Rudewicz, E. Tachikawa, *Chem. Pharm. Bull.* 42 (1994) 1070.
- [18] S. Rebuffat, C. Goulard, S. Hlimi, B. Bodo, *J. Pept. Sci.* 6 (2000) 519.
- [19] M. Mohamed-Benkada, M. Montagu, J.F. Biard, F. Mondeguer, P. Vérité, M. Dalgalarondo, J. Bissett, Y.F. Pouchus, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 1176.
- [20] V. Sabareesh, P. Balaran, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 618.
- [21] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.* 11 (1984) 601.
- [22] K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 16 (1988) 99.
- [23] M. Przybylski, I. Dietrich, I. Manz, H. Brückner, *Biomed. Mass Spectrom.* 11 (1984) 569.
- [24] H. Brückner, W.A. König, M. Aydin, G. Jung, *Biochim. Biophys. Acta* 827 (1985) 51.
- [25] A. Jaworski, H. Brückner, *J. Chromatogr. A* 862 (1999) 179.
- [26] J. Vial, A. Jardy, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2672.
- [27] L. Whitmore, J.K. Chugh, C.F. Snook, B.A. Wallace, *J. Pept. Sci.* 9 (2003) 663.
- [28] Q. Huang, Y. Tezuka, Y. Hatanaka, T. Kikuchi, A. Nishi, K. Tubaki, *Chem. Pharm. Bull.* 43 (1995) 1663.
- [29] Q. Huang, Y. Tezuka, Y. Hatanaka, T. Kikuchi, A. Nishi, K. Tubaki, *Chem. Pharm. Bull.* 44 (1996) 590.
- [30] G. Leclerc, S. Rebuffat, C. Goulard, B. Bodo, *J. Antibiot.* 51 (1998) 170.
- [31] G. Leclerc, C. Goulard, Y. Prigent, B. Bodo, H. Wroblewski, S. Rebuffat, *J. Nat. Prod.* 64 (2001) 164.

Conclusions

En ce qui concerne la méthodologie développée :

Les conditions d'extraction et de purification des peptaïbols à partir de la matrice sédimentaire ont été significativement optimisées à l'aide d'expériences de recouvrement d'analytes. Au cours de ces expériences, la difficulté de désorption des peptaïbols à partir des particules sédimentaires a été mise en évidence. Le sédiment est une matrice très hétérogène, constituée de matériaux détritiques inorganiques et organiques. Les particules inorganiques, principalement constituées d'argiles, de carbonates et de silicates, sont généralement enrobées d'hydroxydes de fer et de manganèse et de films organiques qui confèrent aux sédiments une grande capacité d'adsorption.

Un rendement d'extraction des analytes supérieur à 85% a été obtenu à l'aide d'un mélange acétone/acide acétique 1% v/v, pour des concentrations initiales de 10 ng.g^{-1} de sédiments frais. **Par rapport à la méthode utilisée au préalable (article 1), ce rendement permet de multiplier par dix le taux de récupération des traces de peptaïbols dans la matrice sédimentaire**, justifiant ainsi l'effort d'optimisation réalisé au cours de cette étude. La purification des échantillons a été réalisée à l'aide d'une extraction sur une colonne de silice greffée diol. Le dépôt à sec des extraits en haut de colonne a permis de diminuer significativement la masse d'impuretés contenues dans les échantillons avant l'analyse par CLHP/SM-ES-TI.

L'utilisation de la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse nous a permis de développer la première méthode de quantification des peptaïbols trouvés à l'état de traces dans les sédiments marins. La méthodologie développée est basée sur la détection du signal des adduits sodiques bichargés formés par les peptaïbols à longue séquence les plus fréquents. L'observation de ces adduits permet d'obtenir une première information sur la nature peptidique de la molécule observée. La confirmation de l'appartenance au groupe des peptaïbols est ensuite réalisée par fragmentation SM^2 des ions observés. La comparaison des méthodes de calibration par étalonnage externe (solutions méthanoliques d'alaméthicales) et par la méthode des ajouts dosés (solutions d'alaméthicales au sein de diverses matrices sédimentaires) a mis en évidence un effet matrice élevé, variant en fonction de l'origine des sédiments analysés. Les effets matrice sont un phénomène fréquemment observé lors de l'analyse des matrices naturelles complexes et particulièrement dans le cas des méthodes utilisant le couplage CLHP/SM-ES-TI (Taylor, 2005). Ils sont liés à une altération de l'efficacité d'ionisation des molécules au niveau de la source résultant d'une compétition entre les analytes et des impuretés de la matrice coéluées. Ces effets matrice ne sont pas visibles sur le chromatogramme mais ont des effets négatifs importants sur la sensibilité et la précision de la méthode. **La calibration par la méthode des ajouts dosés permet de corriger efficacement ces atténuations de signal** en tenant compte de la variabilité des matrices sédimentaires.

La validité de la méthodologie analytique a été vérifiée par l'obtention d'une justesse de 2% et d'une fidélité de 1,9% pour une concentration théorique de $9,4 \text{ ng.g}^{-1}$ ($n=6$). **Les limites de**

détection et de quantification des peptaïbols dans les sédiments marins ont été respectivement établies à 250 pg.g^{-1} et 830 pg.g^{-1} de sédiments frais. L'ensemble de la méthodologie développée permet d'obtenir **un résultat satisfaisant de récupération des analytes à l'état de traces, équivalent à $86 \pm 4 \%$** , vérifié par l'analyse d'échantillons de sédiments supplémentés avec de l'alaméthicine à une concentration de 10 ng.g^{-1} ($n=3$).

En ce qui concerne les applications :

La mise au point de cette méthode analytique a permis la quantification des peptaïbols dans des échantillons de sédiments superficiels prélevés sur différents sites du littoral français, afin d'obtenir une première estimation de la contamination. Dans le cadre de ces analyses, la verrerie utilisée a été préalablement nettoyée à l'éthanol 96° puis à l'acétone de manière à écarter toute source de contamination extérieure. Les concentrations mesurées ont été vérifiées par l'analyse en réplicat de chaque échantillon et un blanc «verrerie » a été systématiquement effectué tous les sept échantillons. En raison de l'effet matrice mis en évidence lors du développement de la méthode, les molécules à longue séquence détectées ont été quantifiées à l'aide d'un étalonnage interne réalisé avec le produit d'alaméthicides F50, les coefficients de réponse des alaméthicides et de chacun des autres peptaïbols à longue séquence étant considérés comme identiques. Pour chaque échantillon, trois injections ont donc été réalisées : l'injection de l'échantillon solubilisé dans le méthanol, suivie de deux autres injections de l'échantillon supplémenté avec une solution méthanolique d'alaméthicides F50 à différentes concentrations.

Dans les trois sites ateliers du programme Morest (Baie des Veys, Rivière d'Auray et Marennes Oléron), aucun peptaïbol n'a été mis en évidence dans les sédiments prélevés (concentration $< 250 \text{ pg.g}^{-1}$), et ce quelle que soit la période de prélèvement des échantillons.

Sur le site du Fier d'Ars en mars 2006, une concentration en peptaïbols de $5,2 \pm 2,1 \text{ ng.g}^{-1}$ a été obtenue dans les sédiments superficiels prélevés. La séparation chromatographique a permis de mettre en évidence la présence de quatre molécules, présentant des masses moléculaires respectives de 1936,4, 1937,4, 1950,4 et 1951,4 Da. La différence d'une seule unité de masse entre les composés révèle la présence d'un résidu Gln dans un cas et d'une Glu dans l'autre, définissant respectivement un caractère neutre ou acide. La fragmentation partielle des molécules et la comparaison avec les séquences déjà décrites des longibrachines et des trichokonines, peptaïbols à 20 résidus, montrent que cette dissimilitude est susceptible d'être localisée en position 18. Les peptaïbols de type acide sont élués dans les sept premières minutes, alors que ceux présentant un caractère neutre sont élués de la 8^{ème} à la 11^{ème} minute. Lors de l'étude qualitative des échantillons réalisée sans séparation chromatographique préalable, les profils isotopiques des adduits sodium bichargés apparaissaient confondus rendant impossible la distinction de ces deux types.

Les concentrations en peptaïbols dans les sédiments prélevés à 5 cm de profondeur sur le site du Fier d'Ars ont également été estimées, ne montrant aucune différence significative avec les

concentrations mesurées en surface ($3,4 \pm 1,3 \text{ ng.g}^{-1}$, $n=2$). La nature des peptaïbols mis en évidence est de plus similaire à celle des molécules observées dans les sédiments de surface. En comparaison à la première étude où la présence de *Trichoderma* sp. avait été démontrée dans les sédiments de surface, aucune souche appartenant à ce genre ou à un autre genre connu pour la production de peptaïbol n'a été mis en évidence à la profondeur de 5 cm. Ce résultat fait ressortir la variabilité d'échantillonnage inhérente au développement des organismes dans un environnement vaste tel qu'une zone de vasière. Les molécules détectées dans ces échantillons pourraient donc résulter d'une diffusion des molécules produites plus en surface.

IV.4. Développement d'une méthode de quantification des peptaïbols dans les organismes bivalves

Afin de pouvoir déterminer les concentrations en peptaïbols bioaccumulées par les coquillages, la méthode de dosage par couplage CLHP/SM-ES-TI mise au point sur la matrice sédimentaire a été adaptée aux organismes bivalves. Suite aux résultats antérieurs mettant en évidence la présence de peptaïbols dans les moules prélevées au niveau du Fier d'Ars, l'espèce *Mytilus edulis* a été choisie comme matériel biologique pour cette étude.

La mise au point de la méthodologie a nécessité trois étapes majeures. La première a consisté à la mise au point du protocole d'extraction des peptaïbols à partir de cette matrice de nature bien différente de celle des sédiments. Pour ce faire, la méthodologie développée par Landreau (2001) et utilisée dans le cadre des analyses qualitatives précédentes a été optimisée et comparée à la méthode mise au point sur la matrice sédimentaire. La purification des échantillons sur silice greffée diol a ensuite été étudiée par comparaison des modes de dépôts. La dernière étape a consisté en la détermination des conditions chromatographiques permettant d'obtenir une séparation optimale des analytes et des impuretés de la matrice.

IV.4.1. Matériels et méthodes

IV.4.1.1. Optimisation de l'extraction et de la purification des peptaïbols dans la matrice « moule »

Pour cette étude, des moules collectées sur le site de la rivière d'Auray (47°38'N 2°58'O) en août 2004 ont été utilisées. Les individus ont été conservés à -20°C avant analyse. Après avoir été égouttés et écoquillés, les tissus mous ont été rassemblés et broyés à l'aide d'un Ultra Turrax IKA T18 Basic. Un volume connu d'eau distillée permettant le rinçage du broyeur fut ajouté à l'homogénéat au cours du broyage.

De façon à déterminer les rendements de récupération des peptaïbols en fonction des conditions d'extraction et de purification, des lots de dix grammes d'homogénéat ont été transférés dans des pots à col rodé et dopés à l'aide d'une solution méthanolique d'alaméthines F50 (Sigma, N°A4665) de façon à obtenir une concentration finale de 10 ng.g⁻¹. La verrerie utilisée est préalablement nettoyée à l'éthanol 96° puis à l'acétone de manière à écarter toute source de contamination extérieure.

Deux modes d'extraction faisant intervenir des mélanges de solvants différents ont été testés (Figure IV.8). Le mode A est basé sur la méthodologie décrite par Landreau (2001). Il emploie un mélange méthanol/eau (90 : 10, v/v) dont le pourcentage tient compte du volume d'eau ajouté lors du broyage. Le mode B fait intervenir un mélange acétone/acide acétique (99 : 1, v/v), mélange à fort pouvoir désorbant démontré lors de l'extraction des peptaïbols à partir de la matrice sédimentaire.

Dans chaque cas, l'extraction est réalisée, sous agitation, avec 45 mL de solvant et répétée trois fois. La séparation de la phase organique et de la biomasse a été réalisée par centrifugation, ce qui permet l'amélioration du rendement d'extraction par rapport à une filtration sur cellulose entraînant une perte non négligeable d'analytes. Un partage liquide/liquide avec l'hexane est ensuite réalisé sur la phase MeOH/H₂O obtenue afin d'éliminer les substances les moins polaires. Puis, un ajustement à 30% d'eau est effectué avant le partage liquide/liquide avec le dichlorométhane, partage permettant de récupérer les molécules d'intérêt.

Les extraits chlorométhyléniques obtenus ont ensuite été purifiés par extraction sur silice greffée diol (Supelco, Bellefonte, PA, USA). La colonne est préparée avec 2 g de phase stationnaire. Trois modes de dépôt de l'échantillon ont été étudiés.

- Mode 1 : l'extrait est remis en suspension et déposé en haut de colonne avec 3 mL de dichlorométhane.
- Mode 2 : l'extrait est remis en suspension et déposé en haut de colonne avec 3 mL d'un mélange dichlorométhane/éthanol 98 : 2 (v/v).
- Mode 3 : l'extrait est remis en suspension avec 10 mL d'un mélange dichlorométhane/éthanol 50 : 50 (v/v) et mélangé avec un quart de la phase stationnaire. Le tout est évaporé à sec et déposé en haut de colonne.

L'élution a été réalisée avec une succession de mélanges dichlorométhane/éthanol à pourcentage d'éthanol croissant : 98 : 2 (30 mL), 90 : 10 et 50 : 50 (60 mL) (v/v). Les fractions obtenues (respectivement A, B et C) ont été évaporées à sec et conservées à -20°C avant l'analyse par CLHP/SM-ES-TI.

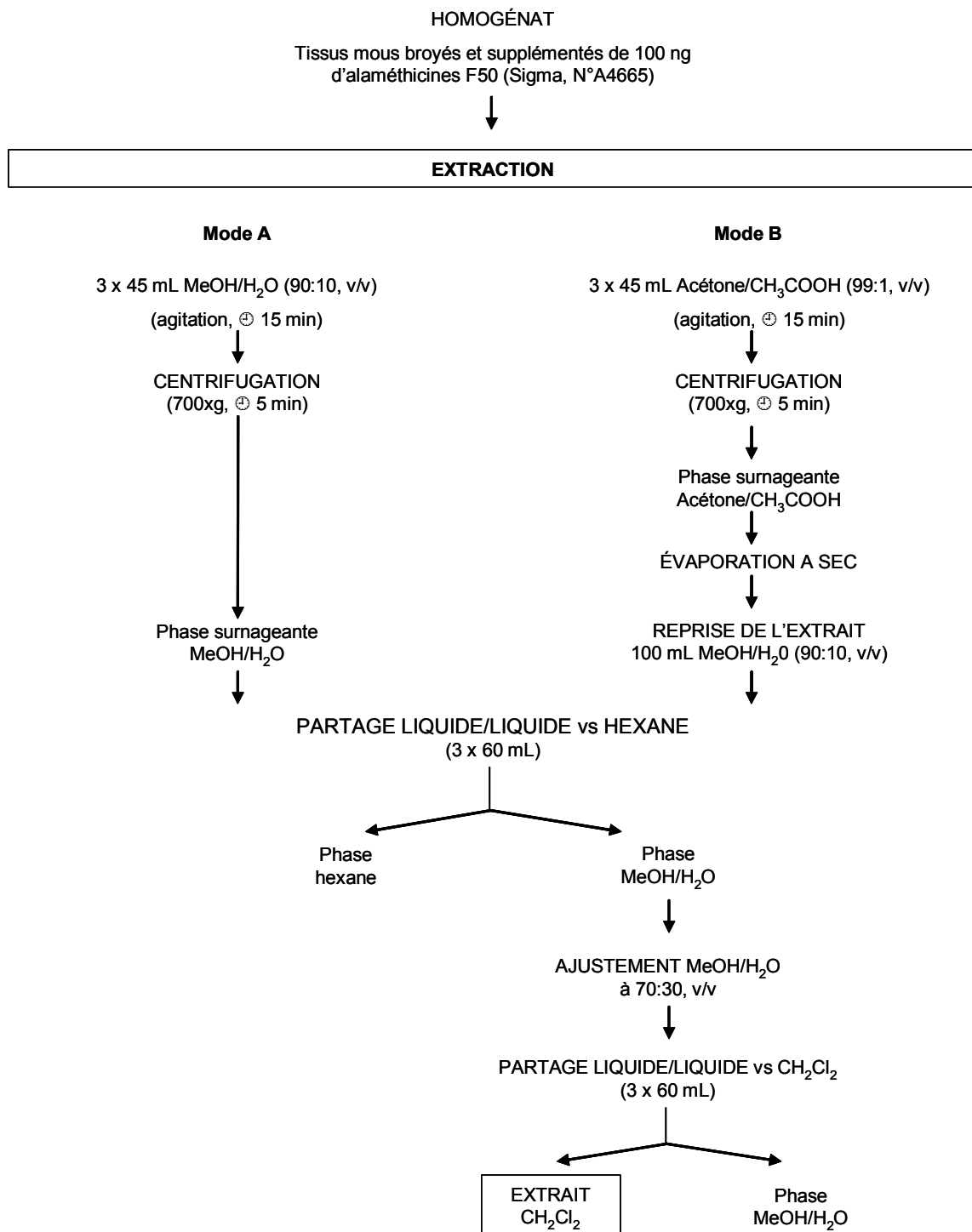


Figure IV.8 : Développement du protocole d'extraction des peptaïbols à partir de la matrice « moule ».

IV.4.1.2. Adaptation de la méthode de dosage par CLHP/SM-ES-TI aux extraits de moules

La séparation chromatographique des fractions purifiées a été réalisée sur une colonne de silice greffée C18 (Kromasil 5 μm , 2 x 250 mm) équipée d'une pré-colonne. Les premiers tests, réalisés en mode isocratique selon les conditions de séparation mises au point pour les extraits sédimentaires (cf. paragraphe IV.3.2), ont montré une quantité importante de composés parasites faiblement polaires dans la matrice, composés contractant des interactions fortes avec la phase stationnaire et entraînant un colmatage progressif de la pré-colonne et de la colonne. De plus, différentes impuretés, coéluées avec les alaméthocines et observées sous forme d'ions monochargés dans les mêmes gammes de rapport m/z , diminuaient considérablement la sensibilité de la méthode.

Les conditions chromatographiques (débit et nature de la phase mobile, durée d'analyse) ont, par conséquent, été modifiées et optimisées à l'aide d'un extrait purifié de moules (fraction B) supplémenté de 100 ng d'alaméthocines avant analyse. La Figure IV.9 résume les différents paramètres du programme d'élution mis au point, permettant une sensibilité et une efficacité de séparation optimale. La température du four a été fixée à 40°C. Le volume d'injection est de 5 μL . La programmation met en jeu une combinaison de modes isocratiques et de gradient permettant l'élution des composés d'intérêt dans les 25 premières minutes et celles des impuretés faiblement polaires de la 30^{ème} à la 50^{ème} minute. La durée d'analyse est établie à 60 min.

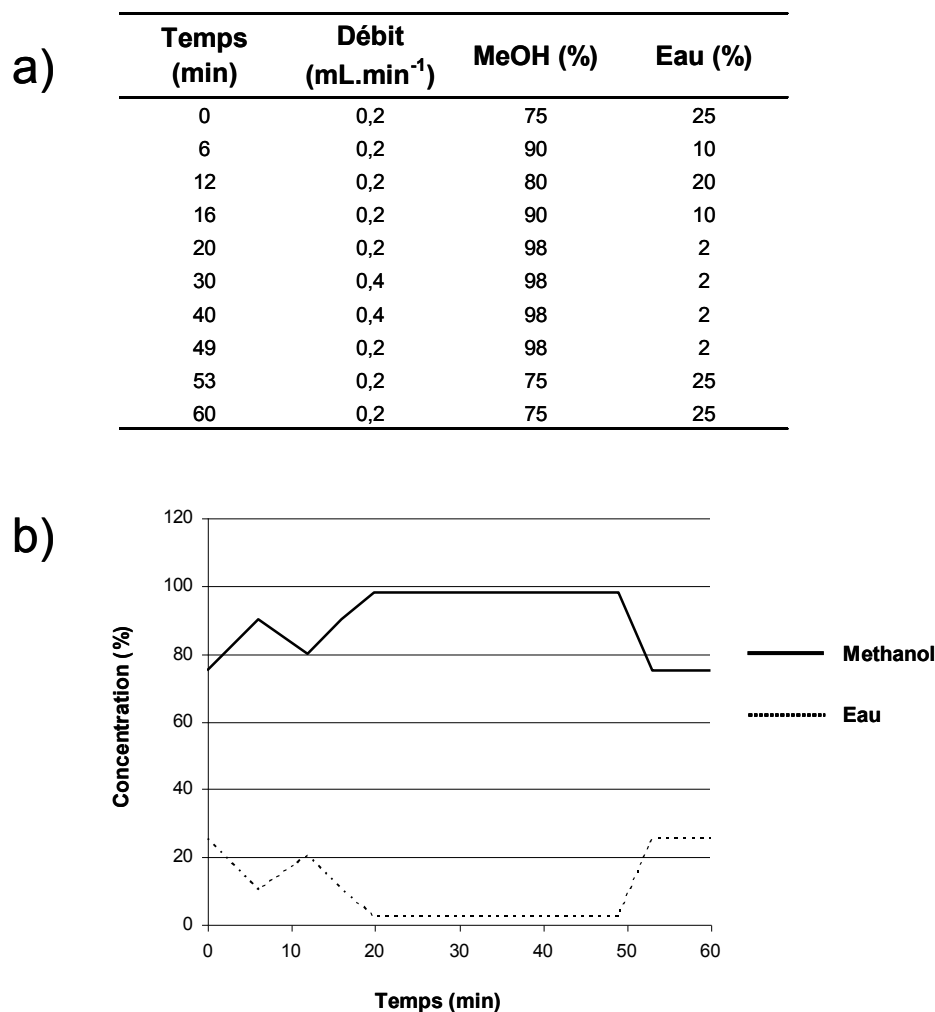


Figure IV.9 : Conditions chromatographiques (nature et débit de la phase mobile) mises au point pour l'analyse des peptaïbols dans les extraits purifiés de moules : a) paramètres d'élution, b) représentation du gradient d'élution en fonction du temps.

Les analytes présents dans les extraits purifiés de moules ont été détectés selon la méthode d'acquisition développée sur la matrice sédimentaire (Poirier *et al.*, 2007a) (Tableau IV.1). La détection est basée sur le signal des adduits sodiques bichargés formés par les peptaïbols à longue séquence les plus fréquents. Un deuxième passage de l'échantillon peut être réalisé en mode SM² Full Scan de manière à fragmenter spécifiquement les ions observés (fenêtre d'isolement : 1 u, énergie de collision : 32 %).

Les méthodes de quantification par étalonnage externe et par ajouts dosés ont été comparées à l'aide du produit commercial d'alaméthines F50. Six niveaux de concentration variant de 0 à 500 ng.mL⁻¹ ont permis d'établir la courbe d'étalonnage. Les effets matrice ont été étudiés par la réalisation de gammes en ajouts dosés préparées en supplémentant juste avant l'analyse chromatographique, des extraits purifiés de moules, avec une solution méthanolique

d'alaméthiçines F50 à différentes concentrations (60, 75, 100, 150 ng.mL⁻¹). Chaque niveau de calibration a été analysé six fois.

La validité de l'ensemble de la méthodologie, de la préparation de l'échantillon à l'analyse quantitative, a été vérifiée par l'analyse d'échantillons de moules supplémentés avec de l'alaméthiçine à une concentration de 10 ng.g⁻¹ (n=3).

Tableau IV.1: Paramètres du spectromètre de masse optimisés pour la quantification des peptaïbols à longue séquence dans la matrice de moules.

<i>Ionisation</i>	<i>Mode positif</i>
<i>Acquisition</i>	<i>Alternance du mode Full Scan sur une gamme de 150 à 2000 m/z permettant l'analyse de tous les ions présents dans la fraction et du mode Zoomscan sur des gammes allant de 870 à 890 m/z et de 985 à 1015 m/z</i>
<i>Gaz vecteur (UA)</i>	89
<i>Gaz auxiliaire (UA)</i>	37
<i>Voltage du spray (kV)</i>	4,5
<i>Température du capillaire (°C)</i>	250,00
<i>Voltage du capillaire chauffé (V)</i>	45
<i>Voltage Lentille Tubulaire (V)</i>	30
<i>Voltage Octopôle 1 (V)</i>	-3,25
<i>Voltage Lentille interoctopôle (V)</i>	-28
<i>Voltage Octopôle 2 (V)</i>	-6

IV.4.2. Résultats et Discussion

IV.4.2.1. Choix des conditions d'extraction et de purification

Aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été observée entre les rendements de récupération des alaméthiçines F50 obtenus avec les différents mélanges utilisés pour l'extraction, les mélanges MeOH/H₂O (90 : 10, v/v) et acétone/acide acétique (99 : 1, v/v), présentant tout les deux un rendement moyen d'extraction très satisfaisant (respectivement, $82 \pm 19\%$ et $81 \pm 16\%$, n=3). L'utilisation du mélange MeOH/H₂O (90 : 10, v/v) permet un nombre d'étapes de manipulation plus limité ainsi qu'une consommation de solvants plus faible. Ce mélange a donc été choisi pour la suite de cette étude.

Par rapport au protocole antérieur (Landreau, 2001) utilisant un mortier, l'étape de broyage faisant intervenir un homogénéisateur mécanique permet d'améliorer considérablement le broyage des tissus. L'étape de centrifugation permet également de diminuer les pertes d'analytes liées à une filtration sur cellulose.

Les résultats relatifs à l'optimisation de la purification des extraits sont présentés dans la Figure IV.10. Pour chaque mode de dépôt testé, les peptaïbols ont été élués en totalité dans la fraction B (fraction à 10% d'éthanol). Ce résultat corrobore celui établi par Landreau (2001), pour qui un maximum d'activité sur larves de diptère était obtenu dans la fraction à 10% d'éthanol.

Aucune différence significative ($P > 0,05$) concernant le rendement de récupération de l'alaméthicine n'a été observée entre les différents modes de dépôt. Le mode 1 présente cependant un coefficient de variation élevé (42%), traduisant une mauvaise dissolution de l'extrait dans le dichlorométhane. Les modes 2 et 3 présentent un rendement de récupération satisfaisant ainsi qu'un faible pourcentage d'impuretés coéluees. Le mode 2 (dépôt avec un mélange de dichlorométhane/éthanol 98 : 2, v/v), plus simple et plus rapide en terme de manipulation, sera préféré au mode 3.

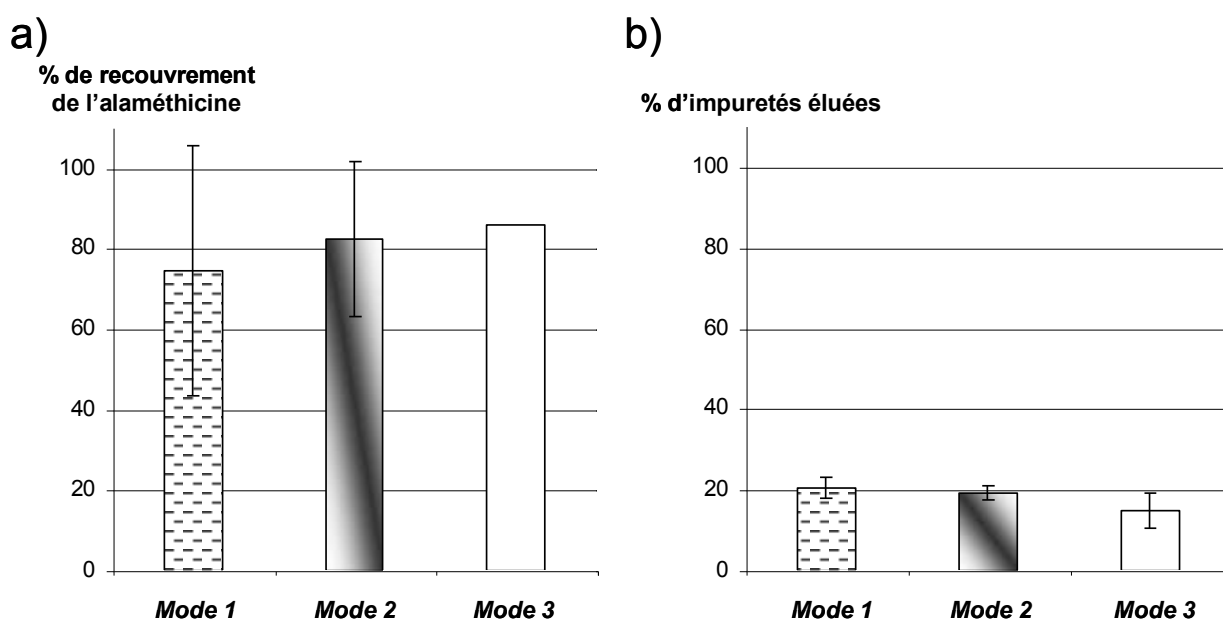


Figure IV.10: Influence du mode de dépôt de l'extrait lors de la purification sur : a) la récupération du standard ; b) le pourcentage d'impuretés coéluees^a.

Mode 1 : dépôt de l'extrait avec du dichlorométhane (n=3)

Mode 2 : dépôt de l'extrait avec un mélange dichlorométhane/éthanol (98 : 2, v/v)(n=3)

Mode 3 : dépôt à sec (a : n=1, b : n=2)

^a Le pourcentage d'impuretés coéluees correspond au rapport de la masse de matrice éluee dans la fraction sur la masse totale d'extrait déposé en haut de colonne.

IV.4.2.2. Quantification des peptaïbols dans la matrice « moule »

La quantification des peptaïbols par étalonnage externe et par la méthode des ajouts dosés a été étudiée à l'aide du standard d'alaméthიცines F50. La calibration est basée sur la somme des aires des deux principaux composants constitutifs du standard, les alaméthიცines F50/5 et F50/7, détectés sous la forme d'adduits sodiques bichargés. Dans nos conditions expérimentales, ces molécules sont respectivement éluées à $16,5 \pm 0,2$ min et $18,3 \pm 0,3$ min ($n=40$) (Figure IV.11).

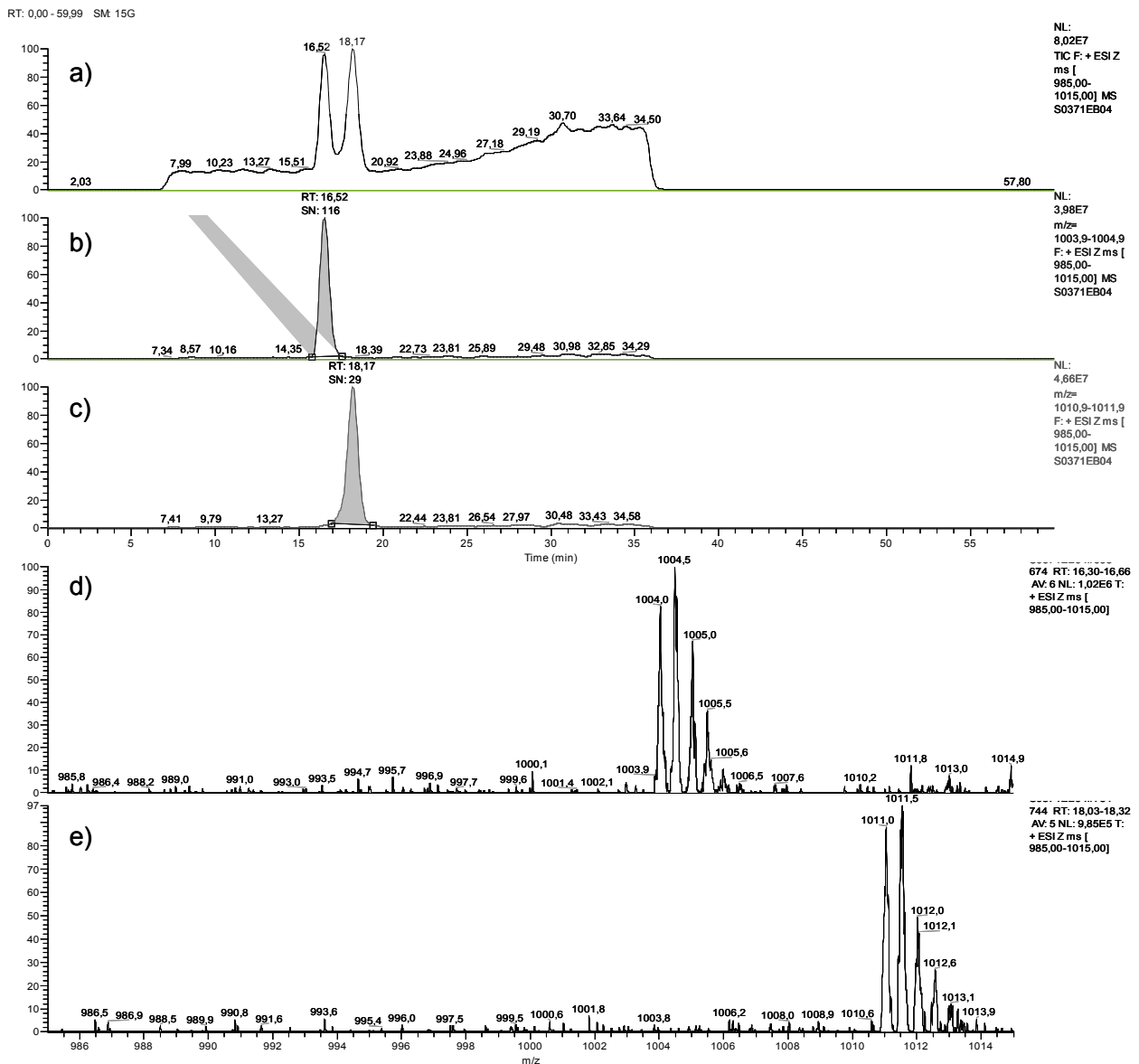


Figure IV.11 : Quantification des peptaïbols dans la matrice “moule” par CLHP/SM-ES-TI, chromatogrammes et spectres de masse du standard d'alaméthიცines F50 (500 ng.mL^{-1}).

a) zoomscan sur la gamme de 985 à 1015 m/z , b) détection de l'ion 1004,4, formé par l'alaméthიცine F50/5, c) détection de l'ion 1011,4, formé par l'alaméthიცine F50/7, d) spectre correspondant au pic de $t_R = 16,52$ min, e) spectre correspondant au pic de $t_R = 18,17$ min.

Les droites d'étalonnage obtenues par étalonnage externe et par la méthode des ajouts dosés sont linéaires dans la gamme de concentrations étudiée (0 à 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$). La comparaison de ces courbes montre que l'effet matrice est nul. L'étalonnage externe pourrait donc permettre une quantification exacte des molécules dans la matrice « moule ». Cependant les résultats ayant été obtenus avec des moules originaires du même site et prélevées à la même période, il conviendra de vérifier si des variations sont observées en fonction des sites et des saisons. Dans ce sens, nous considérerons les deux méthodes de calibration pour le calcul des paramètres de quantification.

Aires des pics

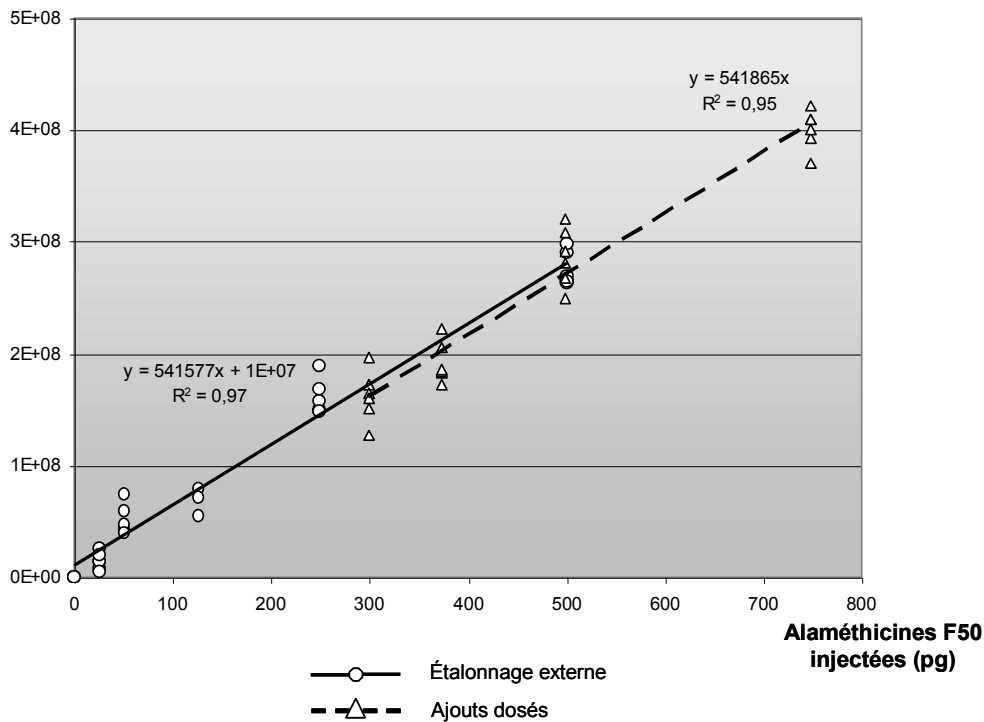


Figure IV.12: Courbes de calibrations obtenues par étalonnage externe et par la méthode des ajouts dosés dans la matrice « moule ».

Les limites de détection et de quantification ont été établies selon la méthode décrite par Vial et Jardy (1999). La limite de quantification (LQ) est déterminée par le niveau de concentration pour lequel un coefficient de variation de 10% est obtenu après l'injection répétée ($n=6$) de chaque niveau de calibration. La limite de détection (LD) est définie comme suit : $LD = LQ/3,3$. Cette méthode permet de s'affranchir de la subjectivité liée à la mesure du bruit de fond, responsable de variations importantes dans la détermination des LD et LQ entre deux opérateurs.

Les LD et LQ des alaméthიცines F50, obtenues par étalonnage externe, sont respectivement de 16 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 53 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Ces valeurs sont environ trente fois plus élevées que celles obtenues lors de la mise au point de l'analyse quantitative dans les sédiments. Notons que différentes opérations de maintenance ont été réalisées sur l'appareil entre ces deux périodes de mise au point, opérations pouvant être à l'origine de la diminution de sensibilité observée. La détermination des LD et LQ des

alaméthიცинес en solution méthanolique, dans les conditions chromatographiques mises au point pour la matrice sédimentaire, permettra une comparaison avec les valeurs précédemment obtenues (article 2) et l'évaluation de la validité de cette hypothèse.

Pour la méthode par ajouts dosés, une LD de 24 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et une LQ de 80 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ont été calculées. Un faible effet matrice sur la sensibilité de détection est donc mis en évidence en comparaison aux solutions méthanoliques, justifiant l'intérêt d'un étalonnage interne pour la quantification des peptaïbols dans la matrice « moule » par CLHP/SM-ES-TI. La validité de la méthodologie analytique a été vérifiée par l'obtention d'une justesse de 2% et d'une fidélité de 4,5% pour une concentration théorique de 16,1 ng.g^{-1} (n=6) (Tableau IV.2). Les limites de détection et de quantification des peptaïbols dans cette matrice biologique ont été respectivement établies à 2,4 ng.g^{-1} et 8 ng.g^{-1} de tissus mous.

Concentration théorique en alaméthიცинес (ng.g^{-1} de tissus mous)	Concentration calculée (ng.g^{-1} de tissus mous) \pm Ecart-type (n=6)	Coefficient de variation (%)	Taux de recouvrement moyen %
6,4	6,4 \pm 0,9	14,2	-0,2
8,1	7,6 \pm 0,7	9,6	-5,1
10,7	11,4 \pm 1,1	9,2	5,9
16,1	15,9 \pm 0,7	4,5	-1,3

Tableau IV.2 : Méthode de calibration par ajouts dosés (matrice « moule ») : justesse et fidélité.

L'ensemble de la méthodologie développée (extraction Mode A, purification Mode 2, cf. IV.4.1.1 ; quantification par CLHP/SM-ES-TI, calibration par ajouts dosés) permet d'obtenir un résultat satisfaisant de récupération des analytes à l'état de traces, équivalent à $82 \pm 19 \%$, vérifié par l'analyse d'échantillons de moules supplémentés avec de l'alaméthიცинес à une concentration de 10 ng.g^{-1} (n=3).

IV.4.3. Conclusions

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis de mettre au point un protocole optimisé d'extraction et de purification des peptaïbols dans la matrice « moule ». Compte tenu de la composition de cette matrice (principalement eau, protéines et lipides), la méthodologie d'extraction et de purification des peptaïbols nécessite un nombre d'étapes plus important, en comparaison à celle développée pour la matrice sédimentaire. L'augmentation de ces étapes est source d'erreurs supplémentaires, diminuant ainsi la précision de répétabilité. L'automatisation des étapes d'extraction liquide/liquide et d'extraction en phase solide pourra donc être envisagée de manière à palier ce phénomène.

La méthode de quantification développée par CLHP/SM-ES-TI permet des limites de détection et de quantification compatibles avec la recherche de traces de peptaïbols dans les mollusques bivalves. Elle permettra, dans un futur proche, la détermination quantitative des molécules bioaccumulées par les moules collectées sur le site du Fier d'Ars. Le temps d'analyse de soixante minutes pourra cependant être diminué dans l'objectif d'un dosage en routine par l'amélioration de la purification des analytes.

Chapitre V

*Évaluation de l'embryotoxicité des peptaïbols et
des sédiments contaminés pour l'huître creuse*

Crassostrea gigas

Chapitre V : ÉVALUATION DE L'EMBRYOTOXICITE DES PEPTAÏBOLS ET DES SEDIMENTS CONTAMINES POUR L'HUITRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS*

V.1. Introduction - contexte

La présence de peptaïbols dans le compartiment sédimentaire des zones conchylicoles représente un risque toxique potentiel pour les organismes marins. Adsorbés sur les particules sédimentaires ou solubilisés dans l'eau interstitielle, les peptaïbols peuvent en effet être accumulés par les organismes benthiques. Les organismes pélagiques pourraient également être exposés à ces métabolites *via* leur relargage dans la colonne d'eau, ou par voie trophique *via* la consommation d'organismes benthiques. Le passage de nombreux contaminants organiques ou inorganiques du compartiment sédimentaire vers la colonne d'eau est ainsi observé au cours de la remobilisation des sédiments qui s'opère lors des phénomènes naturels (marée, tempêtes, bioturbation) ou maîtrisés (dragage) (Chapman et Long, 1983 ; Förstner, 1990 ; Fichet *et al.*, 1998).

La bioaccumulation de ces métabolites par des mollusques bivalves filtreurs (*Mytilus edulis*) a été précédemment montrée lors d'expériences d'exposition réalisées au laboratoire (Sallenave-Namont *et al.*, 1999 ; Landreau, 2001). Les individus ont été exposés pendant 7 jours à un filtrat stérile de culture de *T. koningii* isolé du milieu marin. L'estimation semi-quantitative des composés accumulés a permis de mettre en évidence une accumulation majeure au niveau des hépatopancréas indiquant une contamination par voie digestive. L'exposition n'a pas entraînée la mort des individus sur la période étudiée. Cependant une production de mucus, complexant les composés toxiques, a été constatée pour les individus exposés. Ce phénomène, fréquemment remarqué lors d'expériences d'exposition à d'autres toxines ou contaminants chimiques (Shumway et Cucci, 1987 ; Sze et Lee, 1995 ; Ballance *et al.*, 2002), témoigne d'un mécanisme de défense mis en place par l'individu en réponse à l'exposition. Ces expériences ont donc permis de démontrer que la bioaccumulation des peptaïbols par les moules était responsable d'effets biologiques chez les individus exposés, attestant d'un stress toxique. Néanmoins, les concentrations d'exposition n'étant pas connues, la signification écotoxicologique de ces expériences est relativement limitée.

Au cours de notre étude, nous avons développé une méthode analytique permettant d'extraire les peptaïbols adsorbés sur les particules sédimentaires et de les quantifier. Cependant, les concentrations seules ne permettent pas d'estimer la qualité biologique des sédiments contaminés par ces mycotoxines. La réalisation de bioessais a permis de compléter ces données par des critères biologiques témoignant des effets néfastes sur les organismes. De nombreux bioessais impliquant différents organismes tels que des amphipodes, des nématodes, des échinodermes et des bivalves ont été proposés pour évaluer l'impact potentiel des substances présentes dans l'environnement marin (Carr *et al.*, 1989 ; His *et al.*, 1999a ; His *et al.*, 1999b ; Böttger et McClintock, 2001). Les œufs, les embryons et les larves des bivalves marins, en particulier de *Crassostrea gigas* (huîtres) et de

Mytilus sp. (moules), représentent les organismes les plus fréquemment utilisés dans les tests de toxicité aiguë réalisés afin d'estimer la toxicité de micropolluants tels que les métaux lourds (Connor, 1972 ; Beiras et His, 1994), les pesticides (Armstrong et Millemann, 1974), les polluants organiques (Geffard *et al.*, 2003 ; Geffard *et al.*, 2004), et d'évaluer la qualité biologique des eaux et sédiments des zones côtières sujettes aux apports anthropogéniques (Chapman et Morgan, 1983 ; Beiras et His, 1995). Les embryons et les larves sont moins tolérants aux polluants que les adultes et représentent donc les stades critiques pour la survie d'une espèce. Ainsi, ils constituent des organismes de choix pour les tests de toxicité (Connor, 1972 ; Martin *et al.*, 1981). De plus, compte tenu de la large répartition de l'huître et de la moule dans les zones côtières et de leur intérêt économique majeur, ces bivalves représentent des espèces de choix pour la réalisation de bioessais. Ainsi, dès 1972, Woelke propose l'utilisation de l'huître japonaise, *C. gigas*, pour l'évaluation de la qualité de l'eau de mer (Woelke, 1972) cité par (Quiniou *et al.*, 2005). Depuis, de nombreuses études ont été réalisées et les tests embryo-larvaires de bivalves marins sont parfaitement standardisés (American Society for Testing and Material, 1989). Différentes simplifications du protocole ont été proposées (utilisation de récipients de faible volume en matériel jetable, lecture directe sur microscope inversé) (His *et al.*, 1997), permettant d'envisager une conduite de tests *in situ* (Geffard *et al.*, 2001). Les toxicités potentielles de substances et de mélanges présents dans des échantillons d'eau de mer, d'effluents aqueux et de sédiments peuvent être ainsi déterminées.

En raison des mortalités estivales de juvéniles suivies dans le cadre du programme Morest, nous avons choisi d'effectuer différents bioessais utilisant le développement embryo-larvaire de l'huître creuse *C. gigas* afin d'estimer la toxicité potentielle des peptaïbols et d'évaluer la qualité biologique des sédiments contaminés. De plus, bien que beaucoup d'études aient été consacrées aux activités biologiques des peptaïbols, aucune donnée sur le potentiel embryotoxique de ces molécules n'est disponible ; seulement quelques travaux décrivent leur toxicité larvaire évaluée sur des organismes terrestres ou marins (cf. paragraphe II.4.2.5.b).

Le bioessai sur le développement embryo-larvaire de *C. gigas* est un test d'écotoxicité aquatique aiguë reconnu comme l'un des plus sensibles parmi tous les bioessais classiquement rencontrés (His *et al.*, 1999a). Présentant également l'avantage de fournir des réponses rapides, ce test est réalisable durant la plus grande partie de l'année, en utilisant des géniteurs matures prélevés dans le milieu naturel pendant leurs périodes de reproduction ou provenant d'écloseries où ils ont été conditionnés (Quiniou *et al.*, 2005). La procédure utilisée dans cette étude a suivi celle mise en place par His *et al.* (1997) et par Quiniou *et al.* (2005). Elle consiste à exposer des œufs fécondés à différentes concentrations d'une substance donnée. La fécondation est effectuée avant l'exposition, à l'aide de gamètes mâles et femelles récemment émis (ponte naturelle) et dont la qualité a été préalablement vérifiée par observation microscopique (ovocytes réguliers et légèrement piriformes, spermatozoïdes très mobiles). Si l'induction de la ponte naturelle par stimulation thermique faillit, la scarification des gonades des géniteurs peut être envisagée. Les œufs sont ensuite inoculés dans les différents milieux à tester, et mis à incuber à 24°C pendant 24h ce qui permet aux embryons

d'atteindre le stade de larve véligère, dite larve D. Durant les sept premières heures, le développement embryonnaire se déroule au fond des récipients expérimentaux, jusqu'au stade blastula, où les embryons deviennent ciliés et gagnent la colonne d'eau (His *et al.*, 1999a). Le premier stade larvaire, la trochophore, est atteint 12 h après la fécondation. Le stade larvaire suivant est la larve véligère, obtenue 24 h après la fécondation ; elle possède une coquille et un vélum, organe cilié en forme de voile qui lui permet de nager et de capter des particules alimentaires.

La toxicité potentielle des substances testées est définie à partir des perturbations rencontrées au niveau de l'embryogenèse, permettant de déterminer la concentration efficace (CE_x) induisant des anomalies de développement chez un pourcentage donné d'individus (x) au terme de l'incubation. La gamme de concentration doit être réalisée de manière à observer des effets répartis entre 0 et 100% de développement anormal. Les critères d'effets mesurés sur les larves normales sont une altération de la coquille (charnière non rectiligne, valves inégales ou incomplètes), une hypertrophie du manteau, le blocage à un stade embryonnaire et la mort (Figure V.1) (Quiniou *et al.*, 2005).

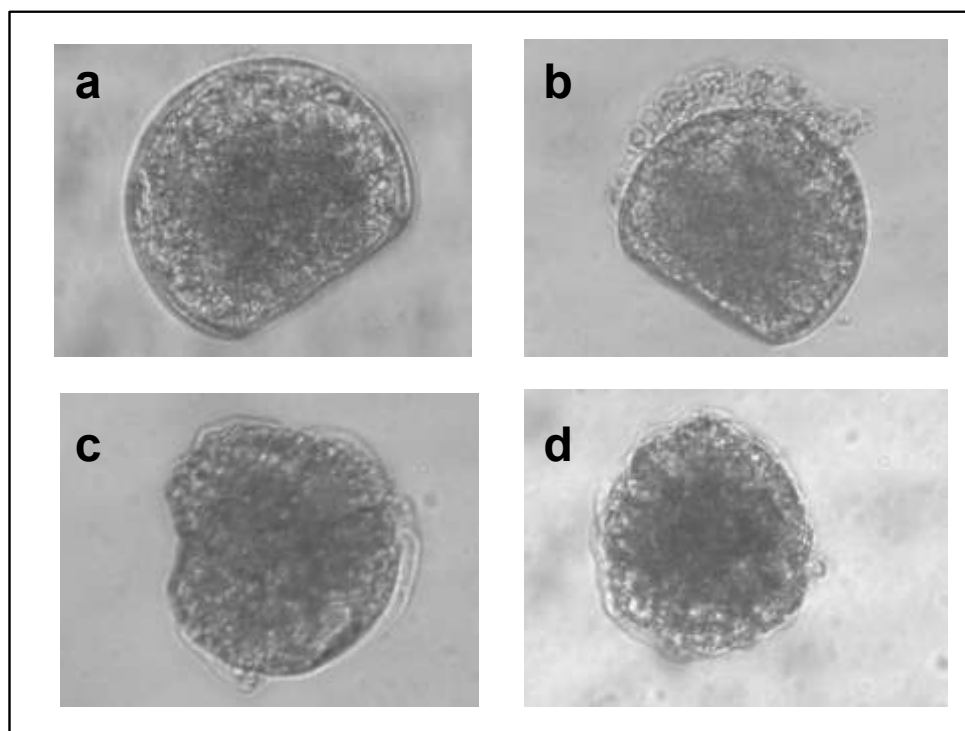


Figure V.1 : Différentes anomalies du développement embryo-larvaire chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. a : larve D normale, b : anomalies du manteau (hypertrophie), c : anomalies de la charnière et de la coquille, d : anomalies du développement (blocage au stade embryonnaire).

Dans notre étude, différents bioessais ont été menés de manière à évaluer les effets embryotoxiques induits par les peptaïbols et les sédiments contaminés du Fier d'Ars. Les toxicités potentielles des peptaïbols à longue séquence et à courte séquence produits par une souche de *T. longibrachiatum* ont été respectivement évaluées. Cette souche, conservée dans la Mycothèque Marine du SMAB sous la référence MMS 151, a été isolée à partir de moules prélevées en parcs

aquacoles à Tharon (Loire-Atlantique, France) en mars 1996 (Sallenave, 1999). Son identification a été réalisée à l'aide d'outils moléculaires (Mohamed-Benkada *et al.*, 2006). Elle a été choisie en raison de son importante capacité de production de peptaïbols et de la diversité des molécules produites (Mohamed-Benkada, 2006) (Ruiz, 2007). La faible solubilité des peptaïbols dans les milieux aqueux, liés au caractère moyennement polaire de ces composés, a cependant posé de nombreux obstacles à la réalisation de ces bioessais. Des expériences préliminaires ont été réalisées, exposant les larves à un filtrat stérile de culture liquide de *T. longibrachiatum*. Deux types de milieux de culture ont été utilisés pour la culture du champignon : un milieu A dérivé du milieu Kolhmeyer et mis au point par Landreau (2001) pour une production optimale de peptaïbols (eau de mer naturelle, salinité 30‰, filtrée 0,2 µm ; glucose 10 g.L⁻¹ ; MgSO₄ 2,4 g.L⁻¹ ; NH₄NO₃ 2,4 g.L⁻¹ ; pH ajusté à 6,3 ± 0,2), et un milieu B plus riche favorisant une croissance rapide du champignon (eau de mer naturelle, salinité 30‰, filtrée 0,2 µm ; glucose 20 g.L⁻¹ ; peptone 10 g.L⁻¹ ; levure 5 g.L⁻¹ ; pH ajusté à 7 ± 0,1). Après 21 jours (milieu A) ou 14 jours de culture (milieu B) à 27°C, une filtration stérilisante des cultures est réalisée. Cette méthode permet d'obtenir les peptaïbols et autres molécules excrétées par le champignon au cours de sa croissance en solution dans un milieu à base d'eau de mer. La solubilisation homogène des peptaïbols dans le milieu d'incubation contenant les larves est ainsi facilitée. Cependant, ce mode de contamination a dû être abandonné en raison de l'embryotoxicité très élevée des filtrats témoins (non ensemencés) observée lors de l'exposition des larves aux deux types de milieux testés.

L'utilisation d'un solvant organique permettant la solubilisation des molécules dans les milieux d'incubation a donc été nécessaire. L'éthanol représente le meilleur solvant de solubilisation des peptaïbols, présentant une limite de solubilité supérieure à 100 mg.mL⁻¹ (Sigma, 2004). Compte tenu de sa miscibilité avec l'eau et de sa faible toxicité, ce solvant a été choisi pour résoudre le problème de dissolution des composés dans l'eau de mer. Aucune perturbation du développement larvaire n'a été observée pour des concentrations inférieures à 0,1% d'éthanol (v/v). Différents groupes de peptaïbols ont alors été testés : un mélange de peptaïbols à longue séquence et un mélange de peptaïbols à courte séquence, tous deux isolés de cultures de *T. longibrachiatum* réalisées sur un milieu Sabouraud (eau de mer naturelle, salinité 30‰, filtrée 0,2 µm ; glucose 40 g.L⁻¹ ; extrait enzymatique de caséine 10 g.L⁻¹ ; NH₄NO₃ 15 g.L⁻¹ ; pH ajusté à 6,3 ± 0,2). En parallèle, un mélange d'alaméthazines F50 (produit N°A4665, Sigma Aldrich) a également été testé.

L'évaluation de la qualité biologique d'un sédiment à l'aide de ce bioessai peut être déterminée en utilisant différents traitements sédimentaires (sédiment contact, eau interstitielle, extraits aqueux ou organiques) (Geffard, 2001). Des extraits aqueux et organiques des sédiments du Fier d'Ars ont été réalisés et testés. L'extrait aqueux, également appelé élutriat, permet d'évaluer la toxicité des substances susceptibles d'être relarguées dans la colonne d'eau lors de la remise en suspension des sédiments (Melzian, 1990). Les sédiments sont mélangés et agités avec de l'eau de mer non contaminée, puis la phase aqueuse surnageante est testée. L'extrait organique correspond à un extrait acétonique purifié des sédiments, réalisé dans le cadre de la quantification de ces métabolites dans la matrice sédimentaire. Cette méthode permettra d'évaluer l'embryotoxicité potentielle des molécules fixées sur les particules sédimentaires.

L'ensemble des résultats acquis sur l'embryotoxicité des différents groupes de peptaïbols testés et sur les extraits aqueux et organiques des sédiments du Fier d'Ars a fait l'objet d'une publication présentée dans les pages suivantes.

V.2. Article 3



Aquatic Toxicology 83 (2007) 254–262

**AQUATIC
TOXICOLOGY**

www.elsevier.com/locate/aquatox

Toxicity assessment of peptaibols and contaminated sediments on *Crassostrea gigas* embryos

Laurence Poirier^{a,*}, Françoise Quiniou^b, Nicolas Ruiz^a, Monique Montagu^a,
Jean-Claude Amiard^a, Yves François Pouchus^a

^a Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, SMAB EA2160, Faculté de pharmacie,
1 rue Gaston Veil-BP 53508, Nantes F-44000, France

^b IFREMER-BE/EX, Centre de Brest-BP 70, 29280 Plouzané, France

Received 5 April 2007; accepted 30 April 2007

Abstract

Peptaibols are known membrane-modifying peptides that were recently detected in marine sediments and mussels collected from a shellfish farming area (Fier d'Ars, Atlantic coast, France). In this investigation, embryotoxicity bioassays with oysters (*Crassostrea gigas*) were performed to assess acute toxicity of alamethicin and different groups of peptaibols produced by a *Trichoderma longibrachiatum* strain isolated from marine environment. *C. gigas* embryos appeared very sensitive to all the metabolites examined with higher toxic effects for long-sequence peptides (EC₅₀ ranging from 10 to 64 nM). D-shaped larvae with mantle abnormality were particularly noticed when peptaibol concentrations increased. Disturbances of embryogenesis were also observed following exposure to organic and aqueous extract of sediments from Fier d'Ars (EC₅₀ = 42.4 and 6.6 g L⁻¹ dry weight, respectively). Although peptaibol concentrations measured in these sediments could explain only a part of the toxic effects observed, this study suggests that these mycotoxins can induce larval abnormalities in a population of exposed animals at environmentally realistic concentrations. Their detection in coastal areas devoted to bivalve culture should be taken into account.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Marine fungi; Mycotoxins; Bivalve bioassay; Embryotoxicity; Risk assessment

1. Introduction

The peptaibols are small linear peptides produced by widely distributed filamentous fungi including terrestrial and marine species (Degenkolb et al., 2003). They constitute the main subgroup (approximately 86%) of the constantly growing family of peptaibiotics including more than 450 reported compounds (Whitmore and Wallace, 2004b). Most of the peptaibiotics (≈80%) have been isolated from fungal strains belonging to the genus *Trichoderma* or its teleomorph *Hypocrea*. They range between 500 and 2200 Da in molecular weight and show a high content of α aminoisobutyric acid, which represents the main common characteristic of these diversified molecules (Chugh and Wallace, 2001). Peptaibols possess an acylated N-terminus and a C-terminal residue that consists of a free 2-amino alcohol (Degenkolb et al., 2003; Degenkolb et al., 2006).

Peptaibols and other peptaibiotics present unique physico-chemical and biological activities depending on particular structural properties. Their helical structures allow them to interact with natural and artificial bilayers to form pores or voltage-dependent ion channels increasing membrane permeability (Rebuffat et al., 1999; Peltola et al., 2004; Whitmore and Wallace, 2004a). Related to this particular ability, a variety of biological activities such as antibacterial, antifungal, and occasionally antiviral, insecticidal and antiparasitic activities have been described. Bioactivity of peptaibiotics includes also uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria, stimulation of catecholamine secretion from adrenal cells, activation of membrane-bound enzymes such as adenylate and guanylate cyclases, cytotoxicity, neurotoxicity and neuroleptic effects (for reviews, see Szekeres et al., 2005 and Krause et al., 2006). The increasing exploitation of peptaibol-producing strains as biological control agents against phytopathogens illustrates the great interest of these peptides (Degenkolb et al., 2006; Xiao-Yan et al., 2006).

* Corresponding author. Tel.: +33 2 51 12 57 52; fax: +33 2 51 12 56 79.
E-mail address: laurence.poirier@univ-nantes.fr (L. Poirier).

In a marine area devoted to bivalve culture (Fier d'Ars, Atlantic coast, France), the presence of peptaibols and peptaibols-producing *Trichoderma* sp. strains has recently been detected in sediments which showed a high toxicity for mussel larvae (*Mytilus edulis*) in the absence of significant contaminations (metals, PCBs, HAPs, pesticides, antibiotics) or eutrophication (Amiard-Triquet et al., 2003; Poirier et al., in press-b). The ability of *Trichoderma* sp. to grow in hypersaline environment and to produce such metabolites has already been demonstrated in laboratory marine-like culture conditions (Landreau et al., 2002; Mohamed-Benkada et al., 2006). Identification of peptaibols in marine natural samples can be considered as a proof of the development of these saprophytic fungi in marine sediments. Presence of these peptides was also reported in marine bivalves (Poirier et al., in press-b) and they were shown to be accumulated by filter-feeder molluscs in experimental contamination inducing physiological stress (Sallenave-Namont et al., 1999). The existence of such compounds in shellfish farming areas could represent a risk for shellfish populations and poisoning risks through the consumption of contaminated shellfish.

The present study was designed to establish a causal relationship between peptaibol concentrations measured in sediments and potential toxic effects for bivalve organisms. Different bioassays using various marine organisms have been proposed to assess the toxicity of pollutants and the biological quality of waters and sediments in coastal areas. The embryotoxicity test with the oyster *Crassostrea gigas* is recognized as one of the most sensitive of all classically used (His et al., 1999). Eggs, embryos and larvae are less tolerant to toxic compounds than adults and therefore represent the critical life stages for toxicological studies (Connor, 1972; Martin et al., 1981). Acute toxicity bioassays using embryo-larval development of *C. gigas* were performed on alamethicin and different groups of peptaibols produced by a strain of *Trichoderma longibrachiatum* isolated from marine environment. To know the potential effects caused by environmental levels, the embryotoxicity of purified extract of Fier d'Ars sediment and its elutriate was also studied.

2. Materials and methods

2.1. Bioassay procedure

The bioassay followed the method reported by His et al. (1997) and Quiniou et al. (2005). Mature adults of *C. gigas* were induced to spawn by thermal stimulation (alternating immersion in seawater of 15 °C and 28 °C for 30 min each time). Spawning males and females were individually isolated in beakers with 0.2 µm natural filtered seawater. The oocytes and sperm of different oysters were observed under an inverted microscope, and the best reproductive pair (regular oocytes and very mobile spermatozoa) was selected for the experiment. Oocytes and sperm solutions, respectively, were sieved through a 100 µm and a 32 µm mesh to remove debris. The oocytes were fertilized using a few milliliters of the sperm-dense solution. Fifteen minutes after fertilization, the embryos were counted and placed in 30 mL transparent polypropylene vessels filled with the different media to be tested (1000 eggs; three replicates per treatment).

The embryos were incubated at 24 °C for 22 h until D-larvae stages were obtained. Cupric sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) was used as a reference toxicant and concentrations of 0 (controls), 20, 40, 60 and 80 µg L⁻¹ were tested on *C. gigas* embryos.

After incubation, 0.5 mL of 8% buffered formalin was added to each vessel, and abnormalities were determined by direct observation of 100 individuals (chosen at random from the 1000 in each vessel). According to His et al. (1997), the categories of abnormal larvae included: segmented eggs, normal or malformed embryos that had not reached the D-larval stage, and D-larvae with shell abnormalities (convex hinge, indented shell margins, incomplete shell) or protruded mantle.

2.2. Peptaibol treatments

2.2.1. General

Embryotoxicity tests were conducted with different groups of peptaibols, alamethicin and microheterogeneous mixtures of peptaibols isolated from a marine strain of *T. longibrachiatum*. In all cases, peptaibols were added to incubation media just before addition of the embryos (≈ 1 min). Peptaibol ethanolic solution (20 µL) was added in 30 mL filtered seawater. Concentrations of ethanolic solutions were prepared in order to test the final following concentrations: 0 (ethanol for control), 1, 10, 50, 100, and 500 µg L⁻¹. For each nominal concentration tested, 0.5 mL of incubation medium was sampled in the beginning ($t=0$) and at the end ($t=22$ h) of the experiment to determine peptaibol concentrations by high performance liquid chromatography (HPLC)/mass spectrometry (MS) according to the method described by Poirier et al. (in press-a). Aqueous aliquot was washed with dichloromethane/methanol mixture with the following proportion: dichloromethane/methanol/aqueous aliquot 2:2:1 (v/v). The aqueous phase containing salts was washed two other times with dichloromethane. The totality of organic phases were then combined and evaporated to dryness before HPLC/MS analysis.

2.2.2. Alamethicin

Alamethicins are 20-residue peptaibols isolated from a strain of *Trichoderma viride* (Sigma-Aldrich, Ref. A4665). The mixture used consisted of analogues F50/5, F50/6a, F50/7 and F50/8b (Kirschbaum et al., 2003; Poirier et al., in press-a).

2.2.3. Peptaibol isolated from a *T. longibrachiatum* marine-related strain

2.2.3.1. Fungal strain and cultures. The strain used for peptaibol production was a *Trichoderma longibrachiatum* Rifai isolated from mussels (*Mytilus edulis*) collected in a marine area devoted to bivalve culture from the estuary of the Loire river (Tharon, France – 47° 10'N 2° 10'W). The original isolate was deposited in the SMAB Marine Fungal collection of University of Nantes as MMS 151 reference. The identification of this strain was based on molecular methods and reported by Mohamed-Benkada et al. (2006). Fungal cultures were performed on dextrose casein agar medium prepared with seawater (dextrose 40 g L⁻¹; enzymatic digest of casein 10 g L⁻¹; agar

15 g L⁻¹) in 20 cm Petri dishes (125 mL of medium/dish). Cultures were incubated for 10 days at 27 °C.

2.2.3.2. Extraction and purification of peptaibols. Fungal biomass (mycelium and conidia) was scraped from the agar surface and steeped three times in dichloromethane/methanol mixture (1:2, 2:1 then 1:1, v/v) for 2 h at room temperature. The combined organic phases were filtered under vacuum (0.45 µm PTFE membrane filters, Sartorius, Göttingen, Germany), washed with water and evaporated to dryness. Chromatography on an open silica gel column (30 mm × 300 mm, 60 Å 35–75 µm, SDS, Peypin, France) was performed on the crude extract obtained with dichloromethane, acetone and methanol as eluants. Two groups of peptaibols (A and B) were eluted in the acetonic and methanolic phases, respectively. A second chromatographic separation on a silica gel column (20 mm × 300 mm) was then performed on each group. Elution was realized with various dichloromethane/methanol mixtures (90:10, 88:12, 85:15, 80:20, v/v). As final step, a preparative HPLC-UV on a modular apparatus including a ConstaMetric III pump (LDC S.A., Paris, France), a SpectroMonitor[®] D (LDC) and a 4.6 mm × 250 mm Inertsil ODS-3 column (Interchim, Montluçon, France) was carried out only on group B fractions to achieve their purification. The mobile phase consisted of a methanol/H₂O (85:15, v/v) mixture delivered at a constant flow rate of 5 mL/min. Detection was performed at 230 nm.

2.2.3.3. Mass spectrometry analysis. The purified fractions of both groups were analyzed on a modular HPLC system consisting of a Spectraphysics Spectra System P2000 pump, an AS 100XR autosampler (Thermo Separation Products, San Jose, CA, USA) equipped with a Kromasil C-18 5-µm reverse-phase 2.0 mm × 250 mm column (Interchim) heated to 40 °C and coupled to a Finnigan Matt LCQ ion-trap mass spectrometer with an electrospray interface (thermo separation products). The mobile phase consisted of a methanol/H₂O (85:15, v/v) mixture delivered at a constant flow rate of 0.2 mL/min. Sample injection volume was 5 µL. All mass analyses were performed in the positive mode. The mass spectrometer parameters were previously adjusted to ensure optimal detection of peptaibols (Poirier et al., in press-a). The spray voltage was set to 4.50 kV, the capillary temperature to 266 °C and the capillary voltage to 42 V. The nitrogen flow rates were, respectively, 89 and 37 (arbitrary units) for sheath and auxiliary gas. Parameters of ion optic transmission were adjusted to 55 V for Tube Lens Offset, -3.50 V for Multipole 1 Offset, -6 V for Multipole 2 Offset and 400 V for Multipole RF Amplifier (peak to peak). MSⁿ analyses were carried out with a collision energy of 32% and an isolation width of 1 u. All spectra acquisitions and reworks were done using LCQ Xcalibur 1.3 software (thermo separation products). The purest fractions were chosen for bioassays.

2.3. Sediment treatments

Sediments from Fier d' Ars (Ré Island—46° 13'N 1° 29'W) were collected in March 2006. All samples were transported

from the site to the laboratory in isothermic containers and frozen at -20 °C until bioassays. The bioassay was conducted with organic extract of sediment and elutriate.

A purified organic extract was prepared according to the method reported in Poirier et al. (in press-a). Briefly, the steps were as follows: extraction of 10 g of sediment wet weight (ww) with 3 × 25 mL of acetone/acetic acid 1% (v/v); sonication of the sediment-solvent mixture for 15 min; centrifugation at 700 × g for 5 min; filtration; evaporation to dryness; purification of crude extracts by vacuum liquid chromatography on a diol-silica gel column (Supelco, Bellefonte, PA, USA); elution performed with successive dichloromethane/ethanol mixtures (100:0, 98:2, 90:10 and 50:50, v/v). The concentrations of peptaibols were determined in each fraction by HPLC/MS analysis and previously reported by Poirier et al. (in press-a). Fractions at 10 and 50% of ethanol, eluting peptaibols, were combined, evaporated and frozen at -20 °C prior to the bioassay.

As reported for peptaibol treatments (see Section 2.2.1), this organic extract was taken up by ethanol and added to incubation media just before the embryos by addition of ethanolic solution (20 µL) in vessels filled with 30 mL filtered seawater. Concentrations of ethanolic solutions were prepared in order to test the final following concentrations equivalent to 0 (ethanol for control), 0.4, 2, and 4 g L⁻¹ of sediment dry weight (dw).

Elutriate was prepared using a modified Melzian method (1990) according to Geffard et al. (2004). Frozen sediments were shaken mechanically at 500 rpm in glass bottles with filtered seawater at a ratio of 1:4 (sediment/water, v/v) for 8 h and allowed to decant for a further 8 h period before removal of the supernatant. For toxicity test, an aliquot was diluted with filtered seawater to the concentrations equivalent to 0 (control), 0.15, 1, 7, 14, 71 and 143 g L⁻¹ of sediment dw.

2.4. Toxicological data analysis

Mean percentage of abnormalities and standard deviation were calculated for each treatment and corrected for effects in control tests by applying Abbot's formula (Emmens, 1948). If abnormalities in the controls (seawater and ethanol) were 20% or more, the test was judged invalid and repeated.

Bartlett's test was used to examine homogeneity of variance. If the data failed this test, arcsin √p transformations were applied to achieve homogeneity. The null hypothesis (peptaibol and sediment treatments had no effects on embryogenesis) was tested by comparison of percentages of abnormal larvae at each concentration to the controls using a one-level ANOVA. Whenever the null hypothesis was rejected ($\alpha = 0.05$), non-linear regressions were performed in order to assess EC₅₀ ± S.D. using Macro REGTOX program (version 7.0.5), according to Vindimian et al. (1983).

Mann-Whitney *U*-tests were performed to examine differences between mean percentage of abnormalities in seawater and ethanol controls, and between mean coefficients of variation (CV) calculated for the peptaibol and copper treatments. Covariance analysis was used to test the difference between the two regression lines established between the two sedimentary treatments.

3. Results

3.1. Validity of bioassays

In the experiments carried out, the seawater controls showed $84 \pm 4\%$ of normally developed embryos of *C. gigas*. No significant difference (Mann–Whitney *U*-test, $P > 0.05$) was found in development to D-larvae in the ethanol controls ($82 \pm 0.2\%$).

Experimentations performed with copper as reference toxicant confirmed the good repeatability of each assay but highlighted differences of embryo sensitivity. For the assay realized to estimate sediment toxicity, a mean $EC_{50} \pm S.D.$ of $40 \pm 0.4 \mu\text{g}$ of $\text{CuSO}_4 \text{ L}^{-1}$ was obtained ($CV = 1\%$, $n = 3$), whereas a mean of $22 \pm 1 \mu\text{g}$ of $\text{CuSO}_4 \text{ L}^{-1}$ ($CV = 5\%$, $n = 3$) was calculated for the assay carried out to determine peptaibol toxicity. These values were both within the EC_{50} acceptability range ($21\text{--}45 \mu\text{g L}^{-1}$) (Quiniou et al., 2005).

3.2. Peptaibol treatments

3.2.1. Identification of peptaibols isolated from the *T. longibrachiatum* strain

Two main peptaibol fractions were obtained from the culture of *T. longibrachiatum* and purified by extraction of fungal biomass, silica gel chromatography and reverse phase HPLC. When analyzed by HPLC/MS, the two-peptide groups appeared as complex mixtures of peptaibol analogues. MS/MS analysis allows identification of the main peptaibols by sequence comparison with literature data.

The first group (Fig. 1A) had $[M + \text{Na}]^+$ ions at m/z 1169.9, 1183.9, 1197.9 and 1211.9, suggesting a mixture of 11-residue peptides similar to trichobrachins A, trichorovins TV, trichorozins, hypomurocins A or harzianins HB and HK (Iida et al., 1995; Wada et al., 1995; Rebuffat et al., 1996; Augeven-Bour et al., 1997; Becker et al., 1997; Mohamed-Benkada et al., 2006).

In the second group (Fig. 1B–D), doubly charged $[M + 2\text{Na}]^{2+}$ ions at m/z 991.2, 991.7, 998.3 and 1002.6 were observed, indicating a mixture of long-sequence peptides with 20 residues, close to longibrachins and trichokonins (Huang et al., 1995; Huang et al., 1996; Leclerc et al., 1998; Leclerc et al., 2001; Landreau et al., 2002).

3.2.2. Observation of abnormalities

Among the different abnormalities observed, abnormal D-shaped larvae with a protruding mantle associated to an irregular shell were frequently recorded in peptaibol treatments (Fig. 2). Compared to the controls for which mantle abnormalities represent $28 \pm 4\%$ of observed deformities, the percentage of larvae developing this category of abnormality significantly increased according to a linear relation with the percentage net response obtained following exposures to the different groups of peptaibols and consequently with the peptaibol concentrations in incubation media ($r = 0.74$, $n = 57$). It reached $66 \pm 13\%$ when the percentage of abnormalities was over 90%.

3.2.3. Embryotoxicity of peptaibols

The results of peptaibols quantification in tested media showed an important and variable decrease of solubilized com-

pounds during the experiment. Expressed as a percentage loss after 22 h (y), this decrease was significantly correlated to the initial peptaibols concentration (x) by the following non linear regression ($r = 0.85$, $n = 10$):

$$y = -14.67 \text{Ln}(x) + 108.79 \quad (1)$$

Thus, the concentrations of peptaibols in incubation media were expressed in effective concentrations measured at the beginning of the experiment.

The effects of each group of peptaibols were significant on *C. gigas* embryogenesis ($P < 0.0001$). In general, an important variability between responses of replicates was observed. The mean coefficient of variation ($35 \pm 19\%$) was significantly superior to the mean CV obtained for copper test ($6 \pm 7\%$) (Mann–Whitney *U*-test, $P < 0.01$) indicating that this lack of repeatability was certainly related to the variation of compound solubility in incubation media.

Alamethicin showed $22 \pm 4\%$ of abnormalities at the lowest concentration tested (0.5 nM ; Fig. 3). Its toxicity increased strongly to reach $64 \pm 38\%$ at 23 nM . No significant increase of abnormalities was observed at higher concentrations. The calculated EC_{50} was $31 \pm 3 \text{ nM}$.

Toxic effects of the long-chain peptaibols isolated from *T. longibrachiatum* were not significantly different from the controls at low concentrations (up to 1.2 nM) (Fig. 3). Percentage of abnormalities increased significantly to reach a maximum of $95 \pm 5\%$ at 61 nM . The EC_{50} was estimated to be $10 \pm 3 \text{ nM}$.

Short-sequence peptaibols isolated from this strain had also significant effects on oyster larval development (Fig. 3). Toxic effects ($24 \pm 12\%$) were noticed at lowest concentration (0.4 nM). Above 4 nM , toxicity reaches a maximum and seems to be independent of the peptide concentration. An EC_{50} of $64 \pm 8 \text{ nM}$ was extrapolated.

3.3. Embryotoxicity induced by sediment extracts

Purified extract of sediments from Fier d' Ars had significant effects on *C. gigas* embryogenesis ($P < 0.002$). No differences were observed between the controls and the lowest concentration tested ($0.4 \text{ g L}^{-1} \text{ dw}$). Abnormalities increased slowly at the higher concentrations and reached $20.5 \pm 5.5\%$ at the highest level tested ($4.2 \text{ g L}^{-1} \text{ dw}$). An EC_{50} of $42.4 \pm 2.7 \text{ g L}^{-1} \text{ dw}$ could be extrapolated.

The corresponding elutriate also had significant adverse effects on embryogenesis ($P < 0.0001$). Its toxicity was not significant at concentrations $\leq 1.4 \text{ g L}^{-1} \text{ dw}$ but increased at higher values to reach 100% of abnormalities at $14.3 \text{ g L}^{-1} \text{ dw}$. The EC_{50} was $6.6 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1} \text{ dw}$.

Fig. 4 shows the linear relationships established between the concentrations of sediment extract or elutriate and the percentage of abnormalities. Covariance analysis revealed no significant difference between the two regression lines, indicating that toxicity of the sedimentary extract and elutriate was similar ($P > 0.05$).

258

L. Poirier et al. / Aquatic Toxicology 83 (2007) 254–262

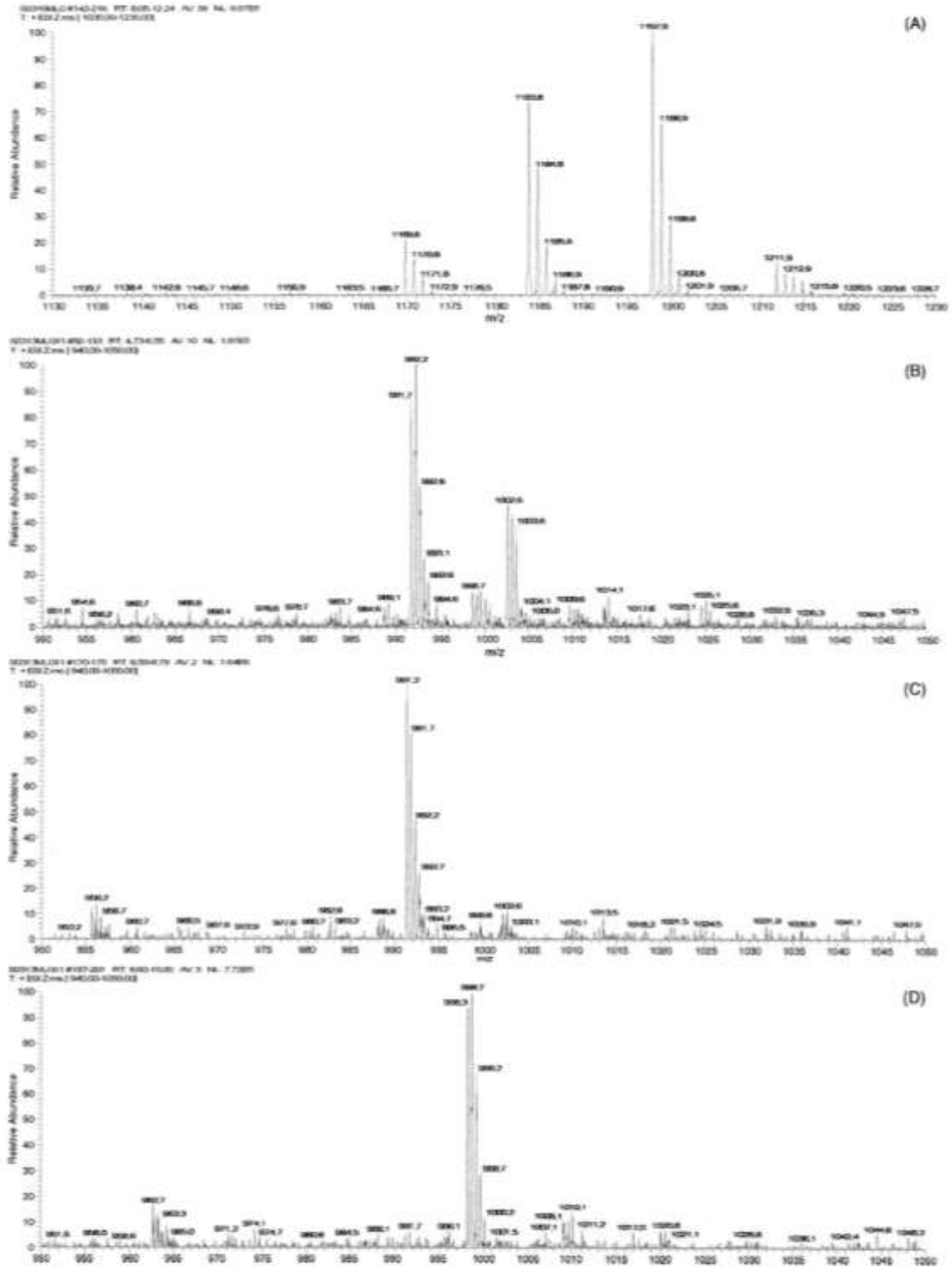


Fig. 1. MS spectra of the two main peptaibol fractions isolated from *Z. longibrachiatum* marine strain. (A) $[M + Na]^+$ ions of short-sequence peptaibol mixture (respectively: $t_R = 8.2, 9.5, 11.2$ and 12 min); (B–D) doubly charged $[M + 2Na]^{2+}$ ions of long-sequence peptaibol mixture observed at respectively t_R of $5.1, 8.8$ and 9.8 min.

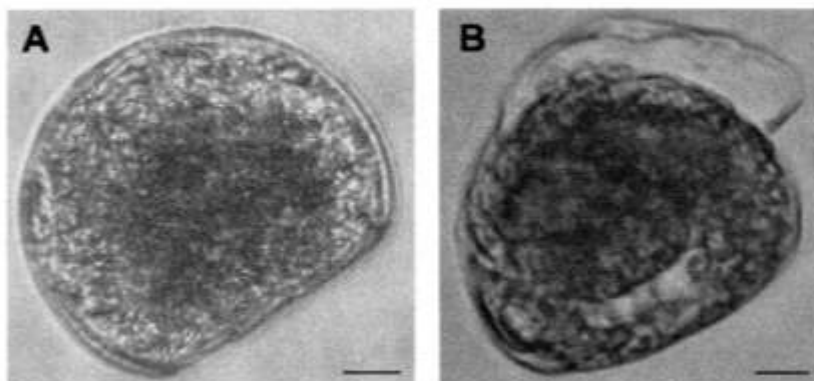


Fig. 2. Normally developed D-shaped larva (A) and D-shaped larva with a protruding mantle associated with an irregular shell margin (B). Scale bars: 10 µm.

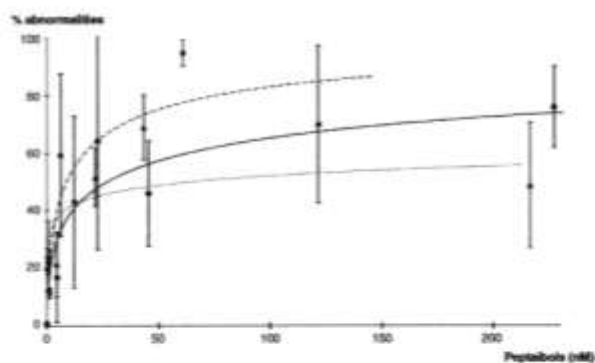


Fig. 3. Peptaibol concentration effects on percentages of abnormal *Crassostrea gigas* development (\pm S.D.). Alamethicin (●—), long-sequence peptaibol mixture (---■---), short-sequence peptaibol mixture (---▲---).

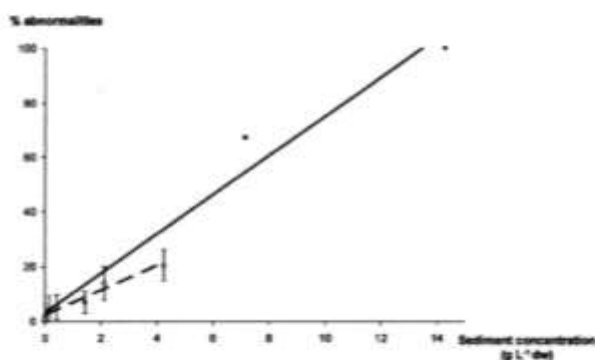


Fig. 4. Effect of the sediment treatments on percentages of abnormal *Crassostrea gigas* development (\pm S.D.): organic extract (---○---) ($r=0.97$, $n=4$), elutriate (---●---) ($r=0.98$, $n=5$).

4. Discussion

4.1. Embryotoxicity of peptaibols

Long and short-sequence peptaibols were shown to disturb embryogenesis of *C. gigas* in the nanomolar concentration range. Toxicity of the fungal peptides was 1.3–8 times higher than the toxicity induced by copper for which an EC_{50} of

86 ± 4 nM was calculated. Although no significant differences between the different groups of peptaibols can be highlighted because of the important variations between replicates, toxic effects based on the estimation of EC_{50} appeared appreciably different. Indeed, compared to short-sequence peptaibol mixture showing an EC_{50} of 64 ± 8 nM, long-sequence peptaibols were associated with a higher toxicity. EC_{50} of 10 ± 3 nM and of 31 ± 3 nM were, respectively, estimated for peptaibols isolated from the *T. longibrachiatum* strain and for alamethicin mixture. Peptaibols are known to have membrane-modifying properties, which are considered as the basis of their broad spectrum of bioactivity. They interact with biological membranes, modify their permeability and form voltage-dependent transmembrane ion-channels (Boheim et al., 1978; Sansom, 1993; Cafiso, 1994; Lucaciu et al., 1997; Duclouier, 2004). Leakage of cytoplasmic material can occur through such channels, leading to cell death (Chugh and Wallace, 2001). With regard to the peptides studied in our work, membrane-modifying properties have been demonstrated for the long-sequence peptaibols, longibrachins, trichokonins, alamethicins, like for the short-sequence ones, trichorovins, trichorozins, harzianins HB and HK (Cafiso, 1994; Huang et al., 1994; Iida et al., 1995; Wada et al., 1995; Cosette et al., 1999; Rebuffat et al., 1999; Leclerc et al., 2001). The permeabilization process has been shown to increase with the helix length and global hydrophobicity of peptaibols (Lucaciu et al., 1997; Rebuffat et al., 2000; Kropacheva and Raap, 2002; Berg et al., 2003; Grigoriev et al., 2003). Consequently, the lower embryotoxicity of short-sequence peptaibol mixture observed in our experiments could be explained by the shorter peptidic chain length.

The augmentation of peptaibol concentration in incubation media lead to a significant increase of mantle abnormalities. The different categories of abnormal larvae were defined by His et al. (1997) on the basis of a study of *C. gigas* larvae isolated from natural environment. In more than 30 years of observations, all of these larvae were classified as perfectly normal straight-hinge D-larvae (His et al., 1999). D-shaped larvae with convex hinges have been described by Nice et al. (2000) as deformity related to exposure to 4-nonylphenol, an endocrine disrupter perturbing calcium metabolism. Therefore, in this investigation, protruding mantle abnormality often associated with irregular shell could be

reasonably assumed to be the result of particular chemical interference of peptaibols with embryolarval development in relation to their membrane interaction properties.

Among all their activities against different target organisms, some effects of peptaibols have been reported on animal larval models. Neurotoxicity of trichokonins was reported on blowfly larvae in millimolar concentration range (Landreau et al., 2002). The acute toxicity of fungal biocontrol agent metabolites was recently evidenced using invertebrate bioassays (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) (Favilla et al., 2006). Alamethicin was confirmed as the most toxic among the peptaibol toxins tested (alamethicin, paracelsin and antiameobin) with LC_{50} in the low micromolar range. Matha et al. (1992) reported the mosquitocidal activity of different representatives of the peptaibol group on *Culex pipiens* larvae in the nM– μ M range. These authors demonstrated that the mode of action of peptaibols was mediated through the damage to mitochondria, as a consequence of the total lysis of the internal mitochondrial contents induced by inhibition of phosphoryl transfer and uncoupling of respiration. In bivalve embryo-larval development bioassay, we could suppose that toxic effects of peptaibols on *C. gigas* larvae were more acute during the first phase of the development of bivalve corresponding to the embryonal stages from the fertilized egg to the ciliated blastula (His et al., 1999).

Micellization studies have demonstrated that alamethicin has a limited solubility in aqueous media and aggregates above concentrations of 10–20 μ M (Archer et al., 1991). A decrease of solubilized compounds in incubation media was observed during our experiment for each group of peptaibols tested and for concentrations inferior to μ M. This phenomenon was shown to be strongly dependent of the initial concentration. The percentage of compounds solubilized in the water column at the end of the experiment was respectively of $20 \pm 30\%$ for the lowest concentrations tested (<50 nM) and $70 \pm 10\%$ for the highest ones (>200 nM). An adsorption of the amphipathic peptides on the vessels could be encountered on a limited number of fixation sites. In these conditions and since embryotoxic effects were significantly observed from the lowest concentrations ranging from 0.4 to 6 nM, the hypothesis of an early action of peptaibols during the first embryonal stages can be supported.

4.2. Embryotoxicity of sediments from Ars

A high toxicity increasing with the concentration was observed following the exposures of *C. gigas* embryos to the two extracts of sediments from Fier d'Ars (organic extract and elutriate).

The organic extract corresponds to an acetic/acetic acid sedimentary extract purified on diol phase gel. Peptaibols related to longibrachins and trichokonins were detected in this extract with a concentration of $7.1 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ (Poirier et al., in press-a). Consequently, an EC_{50} of 0.16 ± 0.01 nM of long-sequence peptaibols could be extrapolated to *C. gigas* embryogenesis. Sediment elutriate corresponds to an aqueous extract of sediments containing suspended inorganic and organic particles as well as any contaminant associated with the particles or the dis-

solved fraction (Melzian, 1990). As is likely for many organic compounds, peptaibols may adsorb on particulate organic matter resuspended during elutriation and thus become available for *C. gigas* embryos. The pattern of toxicity appeared to be similar between the two treatments, in spite of an estimated EC_{50} higher for the elutriate than that extrapolated for the organic extract. However, according to the EC_{50} determined for long-sequence peptaibols (10 ± 3 nM) and the environmental peptaibol concentrations, the toxic effects observed following exposure of embryos to both sedimentary treatments cannot be exclusively induced by the fungal peptides.

In a previous study (Amiard-Triquet et al., 2003), the sediments from Fier d'Ars were considered as "clean" sediments since the total concentrations of metals and organic contaminants are below the first level recommended by the French regulations about sediment quality controls. We also reported a surprising high toxicity of these sediments for embryogenesis in mussel *Mytilus edulis* larvae, in comparable levels to those observed in the present work. Others sources of disturbance as ammonia concentrations, eutrophication or antibacterial drugs used in fish farming were examined but none can be responsible for the observed toxicity.

Although none of the biotic or abiotic stressors studied are in sufficient concentrations to explain the high toxicity of these sediments on bivalve embryogenesis, interaction involving chemical stress and other biotic factors such as peptaibols can occur in the marine environment and could be considered to explain this apparent discrepancy. Furthermore, the toxicological data obtained with pure compounds, slightly water soluble, may not represent the real extent of peptaibol embryotoxicity. The bioavailability of these molecules could be augmented when they are co-solubilized with suspended particulate organic matter.

5. Conclusion

The study presented herein provides the first toxicological data on peptaibol embryotoxicity on marine bivalve development. *C. gigas* embryos appeared to be very sensitive to fungal peptides compared to other animal larval models. It suggests that these molecules at environmentally realistic concentrations can disturb *C. gigas* embryogenesis and can cause an increase in larval deformities in a population of exposed animals. Further studies are necessary to evaluate whether the abnormality found in the larvae of *C. gigas* is disabling, or indeed lethal, and whether this deformity has arisen as a result of membrane permeability perturbations. Concentrations measured in sediments from Fier d'Ars did not fully explain the embryotoxicity observed for these sediments. Additive or synergistic toxic effects with others stressors such as phycotoxins, bacterial toxins or other chemicals usually analysed should be examined.

Acknowledgements

The authors thank Marion Le Goff and Xavier Caisey for their technical participation and Claude Amiard-Triquet for her

scientific advice. This work was partly granted by the French programs MOREST coordinated by Ifremer and GERRICO (region of Pays de la Loire).

References

- Amiard-Triquet, C., Geffard, O., Geffard, A., Budzinski, H., Amiard, J.C., Fichet, D., Poulquien, H., Berthelot, Y., His, E., 2003. Guideline levels of chemical contamination used to assess sediment quality in coastal areas: a contribution to understanding false negative or false positive responses. In: Tremblay, H., Locat, J., Galvez-Cloufier, R. (Eds.), Contaminated Sediments: Characterization, Evaluation, Mitigation/Restoration. Univ. Laval, Québec, pp. 349–354.
- Archer, S.J., Ellena, J.F., Caliso, D.S., 1991. Dynamics and aggregation of the peptide ion channel alamethicin. Measurements using spin-labeled peptides. *Biophys. J.* 60, 389–398.
- Augeven-Bour, I., Rebuffat, S., Auvin, C., Goulard, C., Prigent, Y., Bodo, B., 1997. Harzianin HBI, an 11-residue peptaibol from *Trichoderma harzianum*: isolation, sequence, solution synthesis and membrane activity. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 10, 1587–1594.
- Becker, D., Kiess, M., Brückner, H., 1997. Structures of peptaibols antibiotics hyponurocin A and B from the ascomycetous fungus *Hypocrea murosiana* Hino et Katsumoto. *Lieb. Ann. Recueil.*, 767–772.
- Berg, A., Grigoriev, P.A., Degenkolb, T., Neubof, T., Härtl, A., Schlegel, B., Gräfe, U., 2003. Isolation, structure elucidation and biological activities of trichofumins A, B, C and D, new 11 and 13mer peptaibols from *Trichoderma* sp. HKI 0276. *J. Pept. Sci.* 9, 810–816.
- Boheim, G., Irmscher, G., Jung, G., 1978. Trichotoxin A-40, a new membrane-exciting peptide. Part B. Voltage-dependent pore formation in bilayer lipid membranes and comparison with other alamethicin analogues. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 507, 485–506.
- Caliso, D., 1994. Alamethicin: a peptide model for voltage gating and protein-membrane interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 141–165.
- Chugh, J.K., Wallace, B.A., 2001. Peptaibols: models for ion channels. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 565–570.
- Connor, P.M., 1972. Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 3, 190–192.
- Cosette, P., Rebuffat, S., Bodo, B., Molle, G., 1999. The ion-channel activity of longibrachins LGA I and LGB II: effects of Pro-2/Ala and Gln-18/Glu substitutions on the alamethicin voltage-gated membrane channels. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1461, 113–122.
- Degenkolb, T., Berg, A., Gams, W., Schlegel, B., Gräfe, U., 2003. The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *J. Pept. Sci.* 9, 666–678.
- Degenkolb, T., Gräfenhan, T., Berg, A., Nirenberg, H., Gams, W., Brückner, H., 2006. Peptaibiotics: screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species. *Chem. Biodivers.* 3, 593–610.
- Duclobier, H., 2004. Helical kink and channel behaviour: a comparative study with the peptaibols alamethicin, trichotoxin and antiamoebin. *Eur. Biophys. J.* 33, 169–174.
- Emmens, C.W., 1948. Principles of Biological Assays. Chapman and Hall, London.
- Favilla, M., Macchia, L., Gallo, A., Altomare, C., 2006. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1922–1931.
- Geffard, O., His, E., Budzinski, H., Chiffolleau, J.F., Coynel, A., Etcheber, H., 2004. Effects of storage method and duration on the toxicity of marine sediments to embryos of *Crassostrea gigas* oysters. *Environ. Pollut.* 129, 457–465.
- Grigoriev, P.A., Schlegel, B., Kronen, M., Berg, A., Härtl, A., Gräfe, U., 2003. Differences in membrane pore formation by peptaibols. *J. Pept. Sci.* 9, 763–768.
- His, E., Seaman, M.N.L., Beiras, R., 1997. A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Res.* 31, 351–355.
- His, E., Beira, R., Seaman, M.N.L., 1999. The assessment of marine pollution: bioassays with bivalve embryos and larvae. *Adv. Mar. Biol.* 37, 1–178.
- Huang, Q., Teruka, Y., Kikuchi, T., Momose, Y., 1994. Trichokonin VI, a new Ca^{2+} channel agonist in bullfrog cardiac myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 271, R5–R6.
- Huang, Q., Teruka, Y., Hatamaka, Y., Kikuchi, T., Nishi, A., Tubaki, K., 1995. Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. IV. Minor peptaibols of *Trichoderma koningii*. *Chem. Pharm. Bull.* 43, 1663–1667.
- Huang, Q., Teruka, Y., Hatamaka, Y., Kikuchi, T., Nishi, A., Tubaki, K., 1996. Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. V. Ion-spray ionization mass spectrometric analysis of trichokonin-II, a peptaibol mixture obtained from the culture broth of *Trichoderma koningii*. *Chem. Pharm. Bull.* 44, 590–593.
- Iida, A., Sanekata, M., Wada, S.I., Fujita, T., Tanaka, H., Enoky, A., Fisse, G., Kanai, M., Asami, K., 1995. Fungal metabolites. XVIII. New membrane-modifying peptides, Trichoroizins I-IV, from the fungus *Trichoderma harzianum*. *Chem. Pharm. Bull.* 43, 392–397.
- Kirschbaum, J., Krause, C., Winzheiner, R.K., Brückner, H., 2003. Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled. *J. Pept. Sci.* 9, 799–809.
- Krause, C., Kirschbaum, J., Brückner, H., 2006. Peptaibiotics: an advanced, rapid and selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS. *Amino Acids* 30, 435–443.
- Kropacheva, T., Raap, J., 2002. Ion transport across a phospholipid membrane mediated by the peptide trichogin GA IV. *Biochim. Biophys. Acta* 1567, 193–203.
- Landreau, A., Pouchus, Y.F., Biard, J.F., Sallenave-Namont, C., Robiou du Pont, T., Verbiest, J.F., 2002. Combined use of LC/MS and biological test during rapid identification of marine mycotoxins produced by *Trichoderma koningii*. *J. Microbiol. Meth.* 48, 181–194.
- Leclerc, G., Rebuffat, S., Goulard, C., Bodo, B., 1998. Directed biosynthesis of peptaibol antibiotics in two *Trichoderma* strains. I. Fermentation and isolation. *J. Antibiot.* 51, 170–177.
- Leclerc, G., Goulard, C., Prigent, Y., Bodo, B., Wroblewski, H., Rebuffat, S., 2001. Sequences and antimycoplasmic properties of longibrachins LGB II and LGB III, two novel 20-residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Nat. Prod.* 64, 164–170.
- Lacaci, M., Rebuffat, S., Goulard, C., Duclobier, H., Molle, G., Bodo, B., 1997. Interaction of the 14-residue peptaibols, harzianins HC, with lipid bilayers: permeability modifications and conductance properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1323, 85–96.
- Martin, M., Osborn, K.E., Billig, P., Glickstein, N., 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 12, 305–308.
- Matha, V., Jegorov, A., Kiess, M., Brückner, H., 1992. Morphological alterations accompanying the effect of peptaibiotics, alpha-aminobutyric acid-rich secondary metabolites of filamentous fungi, on *Culex pipiens* larvae. *Tissue Cell* 24, 559–564.
- Meltzer, B.D., 1990. Toxicity assessment of dredged materials: acute and chronic toxicity as determined by bioassays and bioaccumulation tests. In: Alzieu, C., Gallenne, B. (Eds.), Proceedings of the International Seminar on Environmental Aspects of Dredging Activities. Port autonome de Nantes Saint-Nazaire. Nantes, France, pp. 49–64.
- Mohamed-Benkada, M., Montagu, M., Biard, J.F., Mondeguer, F., Véricé, P., Dalgalarrodo, M., Bissett, J., Pouchus, Y.F., 2006. New short peptaibols from a marine *Trichoderma* strain. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 1176–1180.
- Nice, H.E., Thorndyke, M.C., Morrill, D., Steele, S., Crane, M., 2000. Development of *Crassostrea gigas* Larvae is affected by 4-nonylphenol. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 491–496.
- Peltola, J., Ritiemi, A., Mikkola, R., Grigoriev, P.A., Pocsfalvi, G., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., 2004. Biological effects of *Trichoderma harzianum* peptaibols on mammalian cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4996–5004.
- Poirier, L., Amiard, J.C., Mondeguer, F., Quiniou, F., Ruiz, N., Pouchus, Y.F., Montagu, M., in press-a. Determination of peptaibol trace amounts in marine sediments by liquid chromatography/electrospray ionization – ion trap – mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*.

- Poirier, L., Montagu, M., Landreau, A., Mohammed-Benkada, M., Grovel, O., Sallenave-Namont, C., Biard, J., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Pouchus, Y.F., in press-b. Peptaibols, stable markers of fungal development in the marine environment. *Chem. Biodivers.*
- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., 2005. Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux: bio-essai "développement embryo-larvaire de bivalve. In: Ifremer (Ed.), Méthodes d'analyse en milieu marin, pp. 24.
- Rebuffat, S., Hlimi, S., Prigent, Y., Goulard, C., Bodo, B., 1996. Isolation and structural elucidation of the 11-residue peptaibol antibiotic, harzianin HK VI. *J. Chem. Soc., Perkin trans., I* 16, 2021–2027.
- Rebuffat, S., Goulard, C., Bodo, B., Roquebert, M.F., 1999. The peptaibol antibiotics from *Trichoderma* soil fungi; structural diversity and membrane properties. *Recent Res. Devel. Org. Bioorg. Chem.* 3, 65–91.
- Rebuffat, S., Goulard, C., Hlimi, S., Bodo, B., 2000. Two unprecedented natural Aib-peptides with the (Xaa-Yaa-Aib-Pro) motif and an unusual C-terminus: structures, membrane-modifying and antibacterial properties of pseudokonins KL III and KL VI from the fungus *Trichoderma pseudokoningii*. *J. Pept. Sci.* 6, 519–533.
- Sallenave-Namont, C., Pouchus, Y.F., Bardouil, M., Lassus, P., Roquebert, M.F., Verbist, J.F., 1999. Bioaccumulation of mycotoxins by shellfish: contamination of mussels by metabolites of a *Trichoderma koningii* strain isolated in the marine environment. *Toxicol.* 37, 77–83.
- Sansom, M., 1993. Structure and function of channel-forming peptaibols. *Q. Rev. Biophys.* 26, 365–421.
- Szekeres, A., Leitgeb, B., Kredics, L., Antal, Z., Hatvani, L., Manczinger, L., Vagvölgyi, C., 2005. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*: a review. *Acta Microbiol. Immunol.* 52, 137–168.
- Vindimian, E., Robaut, C., Fillion, G., 1983. A method for cooperative and non cooperative binding studies using non linear regression analysis on a microcomputer. *J. Appl. Biochem.* 5, 261–268.
- Wada, S.I., Iida, A., Akimoto, N., Kanai, M., Toyama, N., Fujita, T., 1995. Fungal metabolites. XIX. Structural elucidation of channel-forming peptides, Trichorovins—I–XIV, from the fungus *Trichoderma viridae*. *Chem. Pharm. Bull.* 43, 910–915.
- Whitmore, L., Wallace, B.A., 2004a. Analysis of peptaibol sequence composition: Implications for *in vivo* synthesis and channel formation. *Eur. Biophys. J.* 33, 233–237.
- Whitmore, L., Wallace, B.A., 2004b. The peptaibol database: A database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. *Nucleic Acids Res.* 32, 593–594.
- Xiao-Yan, S., Qing-Tao, S., Shu-Tao, X., Xiu-Lan, C., Cai-Yan, S., Yu-Zhong, Z., 2006. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 260, 119–125.

V.3. Conclusions

Les bioessais réalisés montrent une perturbation du développement embryo-larvaire de *C. gigas* suite à l'exposition des larves aux différents groupes de peptaïbols. Ces perturbations, observées pour des concentrations de l'ordre du nanomolaire, mettent en évidence la sensibilité élevée des embryons et des larves de *C. gigas* vis-à-vis des molécules testées. L'estimation des CE_{50} montre une différence d'embryotoxicité entre les différents groupes. Ainsi, les alaméthincines et le mélange microhétérogène de peptaïbols à 20 résidus isolé d'une souche de *T. longibrachiatum* d'origine marine présentent des CE_{50} respectives de 31 ± 3 nM et 10 ± 3 nM. Les composés à 11 résidus présentent une embryotoxicité relativement plus faible avec une CE_{50} de 64 ± 8 nM. Cette différence d'embryotoxicité entre les molécules pourrait s'expliquer par les différences de longueur des chaînes peptidiques. De nombreux auteurs ont en effet montré que les propriétés d'interaction membranaire des peptaïbols étaient positivement liées à la longueur et à l'hydrophobicité globale des molécules, une activité généralement plus faible est ainsi observée pour les composés à courte séquence (Kropacheva et Raap, 2002 ; Grigoriev *et al.*, 2003 ; Ruiz *et al.*, 2007).

L'augmentation des concentrations en peptaïbols dans le milieu est significativement corrélée à un accroissement de l'observation des anomalies de manteau. L'hypertrophie du manteau associée à un bord de coquille irrégulier pourrait donc être considéré comme le résultat d'une interférence particulière des peptaïbols avec les embryons d'huîtres.

En raison de la solubilité limitée des peptaïbols dans les milieux aqueux, une diminution de la quantité des composés solubilisés dans le milieu d'incubation a été observée au cours du temps. Ce phénomène semble être fortement corrélé à la concentration initiale de départ, suggérant ainsi une adsorption des molécules sur un nombre limité de sites présents sur les récipients en polypropylène utilisés dans cette étude. Dans ces conditions et compte tenu du fait que les effets embryotoxiques des peptaïbols sont observés dès les plus faibles concentrations testées, nous pouvons supposer que les premiers stades du développement embryonnaire sont les stades les plus sensibles à l'action de ces composés.

À la lumière de ces résultats, la présence de peptaïbols dans le milieu marin peut donc représenter un risque toxique réel pour la dynamique de populations des bivalves et ce, à des concentrations réalistes sur un plan environnemental.

Concernant les bioessais réalisés sur les sédiments du Fier d'Ars, une forte embryotoxicité a été observée pour les extraits sédimentaires aqueux et organiques. L'extrait aqueux est susceptible de contenir les contaminants dissous et ceux associés aux particules inorganiques et organiques remobilisées. L'extrait organique contient les peptaïbols à longue séquence extraits du sédiment. Le profil de toxicité obtenu avec ces deux types de traitements est très similaire. Compte tenu de la concentration en peptaïbols mesurée dans l'extrait organique, une CE_{50} de $0,16 \pm 0,01$ nM a pu être déterminée. Au regard de ces résultats et de la CE_{50} calculée précédemment pour les composés à

longue séquence (10 ± 3 nM), les effets toxiques observés ne peuvent pas être expliqués uniquement sur la base des concentrations en peptaïbols mesurées dans ces sédiments.

L'embryotoxicité élevée des sédiments du Fier d'Ars, observée dans cette étude, est comparable à celle obtenue pour les échantillons de sédiments prélevés en 1999 (Amiard-Triquet *et al.*, 2003). De ce fait et étant donné qu'aucun des contaminants biotiques ou abiotiques, recherchés dans le cadre de ces études, permette d'expliquer cette forte toxicité, des potentialisations impliquant les contaminants chimiques et les composés toxiques d'origine biotique tels que les peptaïbols pourraient donc être envisagées. D'autre part, les données toxicologiques obtenues pour les peptaïbols purs, faiblement solubles dans les milieux aqueux, peuvent ne pas représenter la réelle toxicité de ces molécules. Une biodisponibilité accrue pourrait être obtenue lorsqu'elles sont solubilisées avec des matières organiques en suspension.

Chapitre VI

Conclusions générales - Perspectives

Chapitre VI : CONCLUSIONS GENERALES - PERSPECTIVES

Nos travaux s'inscrivent dans la continuité de différentes études visant à déterminer les risques toxiques liés à la présence de moisissures toxigènes en milieu marin et en particulier au niveau des zones conchylicoles, zones représentant un intérêt économique majeur.

La présence de moisissures dans cet environnement a été montrée lors de l'étude de la microfonge isolée de prélèvements du milieu naturel. Cependant, la recherche et la mise en évidence des métabolites, liés au développement fongique en milieu marin, n'avaient jamais été significativement explorées dans ces échantillons (sédiments, organismes marins).

Dans cette étude, plusieurs objectifs ont été réalisés :

- ***Mise en évidence pour la première fois de peptaïbols dans l'environnement marin***

Les peptaïbols sont des métabolites secondaires toxiques principalement synthétisés par les ascomycètes du genre *Trichoderma*. Ces champignons ont été particulièrement remarqués, au cours des études précédentes, pour leur importance dans les différents prélèvements de sédiments ou d'organismes marins et également pour la toxicité élevée de leurs métabolites révélée notamment par un test de neurotoxicité sur larves de diptères.

Au cours de notre étude, la présence de peptaïbols a été démontrée pour la première fois et de manière significative dans des sédiments et des moules prélevés dans une zone conchylicole du Fier d'Ars ; leur recherche ayant été initiée dans les sédiments de ce site en raison d'une embryotoxicité élevée et inexplicée des élutriats sédimentaires pour *Mytilus edulis*. Cette mise en évidence dans des échantillons naturels apporte la preuve du développement des moisissures saprotrophes productrices de peptaïbols dans les écosystèmes marins. La zone conchylicole étudiée forme une baie fermée peu influencée par le mouvement des marées et riche en matière organique. Cet environnement protégé semble constituer un milieu propice à la croissance de ces moisissures saprotrophes, comme l'ont déjà mis en évidence les nombreuses études réalisées sur les populations fongiques des zones littorales. L'implication potentielle de certaines souches de *Trichoderma* sp. dans cette biosynthèse a notamment été démontrée par l'étude des capacités toxigènes des micromycètes isolés des sédiments.

Les peptaïbols détectés dans les moules, issues de gisements naturels localisés sur la baie, confirment la bioaccumulation de ces métabolites par les bivalves filtreurs en milieu naturel. Cette bioaccumulation pourrait résulter d'une filtration des composés solubilisés dans la colonne d'eau et/ou de ceux associés aux spores fongiques. Des souches de *Trichoderma* sp. ont en effet été fréquemment isolées à partir de ces organismes filtreurs (Sallenave-Namont *et al.*, 2000).

En raison de la diversité des activités biologiques des peptaïbols et de leur potentiel toxique, leur présence ainsi que celle des moisissures productrices dans une zone conchylicole représentent un risque toxique pour les organismes marins et constituent également un risque d'intoxication pour l'homme *via* la consommation de ces coquillages bioaccumulateurs.

- Développement de méthodologies analytiques permettant la quantification des peptaïbols dans les matrices naturelles

La détermination des concentrations en peptaïbols dans les différentes matrices naturelles représente un objectif majeur afin de pouvoir appréhender les risques sanitaires potentiels liés à la présence de ces métabolites dans les sédiments et les mollusques bivalves. Or, aucune méthode n'était à ce jour disponible pour ce type d'analyse.

Dans ce sens, les protocoles d'extraction et de purification des métabolites dans les sédiments et les tissus biologiques des moules ont été spécifiquement optimisés, permettant dans chaque cas un rendement de récupération des analytes supérieur à 85%. Les méthodes analytiques développées sont basées sur une séparation chromatographique par CLHP couplée à une détection des adduits sodiques bichargés formés par les peptaïbols à longue séquence par spectrométrie de masse. Le couplage CLHP/SM-ES-TI est apparu comme la technique de choix pour ce développement. L'efficacité de séparation de la CLHP, en amont de la spectrométrie de masse a permis, en effet, une amélioration de la sensibilité et de la spécificité de détection des molécules. Un produit d'origine commerciale d'alaméthazines F50 a été utilisé comme étalon permettant de quantifier les peptaïbols à longue séquence, groupe le plus actif d'un point de vue biologique. La calibration réalisée par la méthode des ajouts dosés a permis de prendre en compte les atténuations de signal liées aux phénomènes de matrice. La validité des méthodes développées a été vérifiée par des critères de justesse et de répétabilité. Des limites de détection équivalentes à 250 pg.g⁻¹ et à 2,4 ng.g⁻¹ ont été respectivement obtenues dans la matrice sédimentaire et dans les tissus biologiques.

Les méthodes ainsi développées autorisent une analyse quantitative sensible et spécifique sur un temps relativement court. Elles sont compatibles avec un objectif de dosage en routine des traces de peptaïbols à longue séquence, présentes dans les matrices environnementales. Afin d'estimer plus précisément la contamination des zones conchylicoles, elles ont été appliquées à des échantillons de sédiments prélevés sur différents sites de la côte Atlantique française.

Des concentrations comprises entre 3,4 et 5,2 ng.g⁻¹ de sédiment frais ont été mesurées dans des prélèvements de 2006 sur le site du Fier d'Ars. Les molécules observées correspondent à certaines détectées dans les échantillons prélevés sept années auparavant mais non quantifiées, indiquant une implantation marquée des souches productrices dans cette zone.

Dans les sédiments prélevés lors de l'été 2004 sur les sites ateliers du programme Morest (Baie des Veys, Marennes Oléron, rivière d'Auray), aucun composé n'a été détecté. Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats. Compte tenu de la large répartition des *Trichoderma* sp. dans l'environnement marin, l'absence totale de souches productrices de peptaïbols dans des zones fermées à semi-fermées telles que le bassin de Marennes Oléron et l'estuaire de la rivière d'Auray semble peu probable. La recherche de micromycètes producteurs devra donc être mise en œuvre dans ces zones. Des quantités présentes, inférieures à la limite de détection, peuvent cependant être envisagées, soulignant ainsi l'intérêt de rechercher et de développer une méthode analytique encore plus sensible. D'autre part, il est fortement envisageable que la méthode d'échantillonnage du sédiment (prélèvement d'une surface localisée) ait une implication particulière dans les résultats obtenus. En effet, la distribution et le développement des microorganismes dans un substrat est souvent très hétérogène. L'isolement des moisissures réalisé à partir d'échantillons d'un même sédiment montre parfois de grandes disparités dans les dénombrements et la nature des espèces isolées. La saison à laquelle sont réalisés les prélèvements peut également influencer sur le développement de ces micromycètes.

Pour obtenir une évaluation significative des concentrations en peptaïbols dans une zone de vase, il sera donc important d'envisager une stratégie d'échantillonnage par transect ou quadrillage, et d'évaluer l'influence saisonnière par des prélèvements échelonnés sur un cycle annuel. D'autre part, des prélèvements permettant la recherche des souches fongiques présentes devront être systématiquement réalisés en parallèle.

La mise au point de la méthodologie analytique permettant la quantification des peptaïbols dans les tissus biologiques permettra d'analyser les différents échantillons de moules prélevés dans le cadre du programme Morest et sur le site du Fier d'Ars. Les concentrations dans les organismes représentent un meilleur indicateur de la qualité du milieu que les concentrations sédimentaires, qui ne permettent pas d'estimer la biodisponibilité des molécules pour les organismes et pour lesquelles des fluctuations plus importantes sont généralement observées.

- **Évaluation du risque toxique et de la qualité biologique des sédiments du Fier d'Ars**

Suite aux concentrations mesurées dans les sédiments du Fier d'Ars, des tests biologiques ont permis de démontrer l'embryotoxicité élevée des peptaïbols pour le développement embryonnaire de l'huître creuse *C. gigas*. Une supériorité d'activité des molécules à longue séquence a été obtenue, en comparaison à celle observée pour les molécules à courte séquence. Cependant, pour chacun des groupes testés, les perturbations de l'embryogenèse ont été observées pour des concentrations comprises entre 10 et 64 nM (équivalent à des concentrations massiques comprises entre 20 et 74 ng.mL⁻¹). Ces observations démontrent que la présence de ces métabolites fongiques dans l'environnement marin représente un risque pour la dynamique des populations de bivalves et particulièrement pour le recrutement des juvéniles, et ce à des concentrations réalistes sur le plan

environnemental. Des études devront cependant être réalisées de manière à caractériser les mécanismes précis de remobilisation de ces composés, faiblement solubles dans l'eau, lors de la remise en suspension des sédiments. Il sera également nécessaire d'évaluer précisément leur stabilité au sein des sédiments et leur biodisponibilité pour les organismes benthiques. Ces résultats démontrent, enfin, l'intérêt d'étendre la méthode de quantification des peptaïbols au groupe des courtes séquences, biosynthétisés généralement de façon commune aux longues séquences, de façon à obtenir une estimation plus juste des concentrations environnementales. En l'absence de composés commercialisés, l'étalonnage pourra être développé à l'aide d'un composé isolé à partir de cultures *in vitro* et purifié après différentes étapes de CLHP.

La réalisation de ces tests biologiques a également permis de confirmer l'embryotoxicité élevée des sédiments du Fier d'Ars, précédemment observée (Amiard-Triquet *et al.*, 2003). Cependant, les concentrations en peptaïbols, comprises entre 3,4 et 5,2 ng.g⁻¹ dans ces sédiments, ne peuvent expliquer seules cette toxicité. L'hypothèse d'une synergie entre les contaminants chimiques et les biomolécules synthétisées par les microorganismes marins, telles que les peptaïbols ou les phycotoxines, pourrait donc être envisagée. Une étude préalable, réalisée au laboratoire, a ainsi montré une potentialisation de la neurotoxicité des peptaïbols par l'acide domoïque, phycotoxine neurotoxique, par un facteur d'environ trois (Reculeau, 2003). Il est donc important d'effectuer des recherches supplémentaires dans ce sens afin d'évaluer précisément ces mécanismes de synergies, sur lesquels très peu de données sont actuellement disponibles.

L'ensemble des résultats acquis au cours de ce travail souligne l'importance des recherches effectuées jusque là sur les métabolites fongiques toxiques en milieu marin. Au regard de la présence de peptaïbols dans les sédiments marins et de leur bioaccumulation dans les bivalves filtreurs par voie digestive, la responsabilité de ces métabolites dans les phénomènes de toxicités inexplicables enregistrés par le REPHY pourrait être sérieusement envisagée. Ces épisodes de toxicité sont révélés par un bioessai sur souris, utilisé comme méthode de référence pour l'évaluation des toxines lipophiles susceptibles d'être présentes dans un extrait de glandes digestives de coquillages (le plus souvent moules et huîtres). Ce test présente les meilleures performances pour la mise en évidence d'une toxicité globale au regard de l'ensemble des familles de toxines lipophiles (acide okadaïque et dérivés, pecténotoxines, yessotoxines, azaspiracides, spirolides, gymnodimines) (Amzil, 2006). Cependant, ce test « souris » n'est pas spécifique et conduit à l'observation de nombreux « faux positifs », pour lesquels des symptômes neurologiques atypiques sont parfois observés. Ces « faux positifs » correspondent à une situation où l'extrait donne un résultat positif dans le bioessai sur souris et pour lequel, par analyse chimique, la teneur en toxines réglementées est inférieure au seuil réglementaire. D'autres facteurs toxiques peuvent donc être responsables de cette positivité. Deux origines sont possibles : soit une toxicité atypique que l'on ne connaît pas, soit des synergies d'actions entre les différentes toxines présentes. Au regard de la lipophilie des peptaïbols et de leur neurotoxicité élevée notamment mis en évidence sur souris (Grigoriev *et al.*, 2003 ; Ovchinnikova *et*

al., 2007 ; Ruiz, 2007), l'implication de ces métabolites fongiques toxiques dans l'occurrence de ces faux positifs est donc envisageable.

Dans un cadre de vigilance vis-à-vis de la santé du consommateur de coquillages, il nous semble donc primordial de tenir compte de ces molécules lors de la réalisation des tests souris et d'évaluer leurs concentrations dans les extraits de glandes digestives de coquillages à l'aide de la méthodologie développée dans ce travail. Des études supplémentaires devront être spécifiquement conduites afin de déterminer la synergie d'action entre ces composés et les phycotoxines liposolubles.

Un large éventail d'études s'ouvre à la recherche suite à la mise en évidence de peptaïbols dans l'environnement marin et à la mise au point de leur quantification dans les matrices environnementales.

L'exposition des organismes aux peptaïbols pourra être estimée par la détermination précise des concentrations dans les zones conchylicoles susceptibles d'être favorable au développement d'une microfonge saprotrophe. Un inventaire des sites contaminés, associé à l'étude des variations spatiales et saisonnières pourra ainsi être réalisé. Pour ce faire, les prélèvements de sédiments devront être réalisés selon une méthode d'échantillonnage adaptée. L'étude pourra être étendue aux pieux en bois utilisés pour les activités conchylicoles, représentant également un substrat favorable à l'implantation de souches lignicoles, telles que celles du genre *Trichoderma*. Cette recherche devra s'accompagner de l'étude des moisissures saprotrophes présentes. Cela permettra d'apporter, d'autre part, des éléments nouveaux dans nos connaissances sur les facteurs écologiques contrôlant la physiologie de développement de ces moisissures dans l'écosystème marin. Des méthodes permettant de quantifier simultanément les molécules à longue et à courte séquence devront être développées de façon à être plus proche des concentrations environnementales.

La bioaccumulation de ces composés par les organismes marins pourra être caractérisée par l'évaluation des concentrations en peptaïbols dans les organismes des zones benthiques et pélagiques et notamment dans les mollusques bivalves, échantillonnés sur différents sites et à différentes saisons. L'étude des facteurs régissant la biodisponibilité des peptaïbols au sein des sédiments et leur passage du compartiment sédimentaire à la phase particulaire dissoute permettront de mieux estimer le transfert de ces molécules aux organismes. De la même manière, des études expérimentales pourront être réalisées de façon à déterminer précisément les phénomènes de bioaccumulation et d'élimination de ces molécules par les organismes suspensivores. Dans ce sens, des expériences sont actuellement en cours de réalisation sur des moules de filières. Les résultats préliminaires obtenus montrent un organotropisme marqué avec des concentrations six fois plus élevées dans les hépatopancréas que dans les tissus mous, confirmant la bioaccumulation de ces composés par voie digestive. D'autre part, à l'image de la bioamplification de nombreux composés lipophiles dans la chaîne alimentaire, le risque pour le consommateur humain pourra être évalué à travers des études de transfert trophique du coquillage aux mammifères.

Dans un dernier temps, les effets néfastes provoqués par les peptaïbols sur les embryons et les larves d'huîtres ont été démontrés dans le cadre de cette étude. Ils pourront cependant être évalués pour d'autres espèces marines et également pour des organismes au stade adulte, pouvant présenter parfois une sensibilité plus importante que les stades larvaires.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

Abd-Elaah, G.A., 1998. The occurrence of fungi along the Red Sea coast and variability among isolates of *Fusarium* as revealed by isozyme analysis. *J. Basic Microbiol.* 38, 303-311.

Afssa, 2006. Rapport scientifique de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation du dispositif de surveillance du milieu et à l'évaluation du risque lié à la consommation des coquillages, notamment dans la situation du bassin d'Arcachon. N°2006-SA-0254, 40 p.

Alzieu, C., (coord), 2003. Bioévaluation de la qualité environnementale des sédiments portuaires et des zones d'immersion. Ifremer, 248 p.

American Society for Testing and Material, 1989. E724-98 Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs, ASTM, Philadelphia, 21 p.

Amiard-Triquet, C., Geffard, O., Geffard, A., Budzinski, H., Amiard, J.C., Fichet, D., Pouliquen, H., Berthelot, Y., His, E., 2003. Guideline levels of chemical contamination used to assess sediment quality in coastal areas: a contribution to understanding false negative or false positive responses. In: Tremblay, H., Locat, J., Galvez-Cloutier, R. (Eds.), Contaminated Sediments : Characterization, Evaluation, Mitigation/Restoration. Univ. Laval, Québec, pp. 349-354.

Amzil, Z., Marcaillou-Lebaut, C., Bohec, M., 1996. Unexplained toxicity in molluscs gathered during phytoplankton monitoring. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Furuyo, Y. (Eds.), Harmful and toxic alga blooms. Int. Oceanogr. Com. Of UNESCO, Sandai, Japan, pp. 543-546.

Amzil, Z., 2006. Guide et Manuel, Complexe des toxines lipophiles - Document de méthode REPHY, Ifremer, Nantes, 40 p.

Archer, S.J., Cafiso, D.S., 1991. Voltage-dependent conductance for alamethicin in phospholipid vesicles. A test for the mechanism of gating. *Biophys. J.* 60, 380-388.

Armstrong, D.A., Millemann, R.E., 1974. Effects of the insecticide sevin and its first hydrolytic product, 1-naphthol, on some early developmental stages of the bay mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 28, 11-15.

Artalejo, A.R., Montiel, C., Sanchez-Garcia, P., Uceda, G., Guantes, J.M., Garcia, A.G., 1990. Alamethicin-evoked catecholamine release from cat adrenal glands. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 169, 1204-1210.

- Arvanitidou, M., Kanellou, K., Katsouyannopoulos, V., Tsakris, A., 2002. Occurrence and densities of fungi from northern Greek coastal bathing waters and their relation with faecal pollution indicators. *Wat. Res.* 36, 5127-5131.
- Augeven-Bour, I., Rebuffat, S., Auvin, C., Goulard, C., Prigent, Y., Bodo, B., 1997. Harzianin HB I, an 11-residue peptaibol from *Trichoderma harzianum*: isolation, sequence, solution synthesis and membrane activity. *J. Chem. Soc., Perkin trans., I* 10, 1587-1594.
- Auvin-Guette, C., Rebuffat, S., Prigent, Y., Bodo, B., 1992. Trichogin A IV, an 11-residue lipopeptaibol from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 2170-2174.
- Auvin-Guette, C., Rebuffat, S., Vuidepot, I., Massias, M., Bodo, B., 1993. Structural elucidation of trikoningins KA and KB, peptaibols from *Trichoderma koningii*. *J. Chem. Soc., Perkin trans., I* 2, 249-255.
- Bak, M., Bywater, R.P., Hohwy, M., Thomsen, J.K., Adelhorst, K., Jakobsen, H.J., Sorensen, O.W., Nielsen, N.C., 2001. Conformation of Alamethicin in Oriented Phospholipid Bilayers Determined by ¹⁵N Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. *Biophys. J.* 81, 1684-1698.
- Ballance, S., Sheehan, J.K., Tkachenko, A., McCrohan, C.R., White, K.N., 2002. Interaction of mucus with freshly neutralised aluminium in freshwater. *J. Inorg. Biochem.* 92, 11-18.
- Barghoorn, E.S., Linder, D.H., 1944. Marine fungi: their taxonomy and biology. *Farlowia* 1, 395-467.
- Baumann, G., Mueller, P., 1974. A molecular model of membrane excitability. *J. Supramol. Struct.* 2, 538-557.
- Becker, D., Kiess, M., Brückner, H., 1997. Structures of peptaibols antibiotics hypomurocin A and B from the ascomycetous fungus *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto. *Lieb. Ann. Recueil.*, 767-772.
- Beiras, R., His, E., 1994. Effects of dissolved mercury on embryo-genesis, survival, growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 113, 95-103.
- Beiras, R., His, E., 1995. Toxicity of fresh and freeze-dried hydrocarbon-polluted sediments to *Crassostrea gigas* embryos. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 47-49.
- Bel Hassen, M., 2001. Spatial and temporal variability in nutrients and suspended material processing in the Fier d'Ars bay (France). *Estuar. Coast Shelf S.* 52, 457-469.
- Benedetti, E., Bavoso, A., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., Toniolo, C., Bonora, G.M., 1982. Peptaibol antibiotics: a study on the helical structure of the 2-9 sequence of emerimicins III and IV. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 7951-7954.

- Berg, A., Ritzau, M., Ihn, W., Schlegel, B., Fleck, W., Heinze, S., Gräfe, U., 1996. Isolation and structure of bergofungin, a new antifungal peptaibol from *Emericellopsis donezkii* HKI 0059. *J. Antibiot.* 49, 817-820.
- Berg, A., Schlegel, B., Ihn, W., Demuth, U., Gräfe, U., 1999. Isolation and structural elucidation of new peptaibols, Bergofungins B, C, D from *Emericellopsis donezkii* HKI 00597. *J. Antibiot.* 52, 666-669.
- Berg, A., Grigoriev, P.A., Degenkolb, T., Neuhofer, T., Härtl, A., Schlegel, B., Gräfe, U., 2003. Isolation, structure elucidation and biological activities of trichofumins A, B, C and D, new 11 and 13mer peptaibols from *Trichoderma* sp. HKI 0276. *J. Pept. Sci.* 9, 810-816.
- Bessler, W.G., Ottenbreit, B., Irmischer, G., Jung, G., 1979. Interaction of membrane modifying peptide antibiotics from *Trichoderma viride* with leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 87, 99-105.
- Beven, L., Wroblewski, H., 1997. Effect of natural amphipathic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes. *Res. Microbiol.* 148, 163-175.
- Beven, L., Duval, D., Rebuffat, S., Riddell, F.G., Bodo, B., Wroblewski, H., 1998. Membrane permeabilisation and antimycoplasmic activity of the 18-residue peptaibols, trichorzins PA. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1372, 78-90.
- Bhatt, M., Zhao, J.-S., Halasz, A., Hawari, J., 2006. Biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine by novel fungi isolated from unexploded ordnance contaminated marine sediment. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 850-858.
- Biemann, K., 1988. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 16, 99-111.
- Bodo, B., Rebuffat, S., El Hajji, M., Davoust, D., 1985. Structure of trichorzianine A IIIc, an antifungal peptide from *Trichoderma harzianum*. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 6011-6017.
- Boheim, G., 1974. Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes. *J. Membrane Biol.* 19, 277-303.
- Boheim, G., Irmischer, G., Jung, G., 1978. Trichotoxin A-40, a new membrane-exciting peptide. Part B. Voltage-dependent pore formation in bilayer lipid membranes and comparison with other alamethicin analogues. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 507, 485-506.
- Bökman, C.F. (Ed.), 2002. Analytical Aspects of Atmospheric Pressure Ionisation in Mass Spectrometry. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, Uppsala, 48 p.
- Bonnafous, J.C., Dornand, J., Mani, J.C., 1979. Detergent-like effects of alamethicin on lymphocyte plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 86, 536-544.

- Böttger, S.A., McClintock, J.B., 2001. The effects of organic and inorganic phosphates on fertilization and early development in the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Comp. Biochem. Physiol., Toxicol. Pharmacol.* 129, 307-315.
- Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J., Reymond, P., Sanglier, J., Vayssier, Y., Veau, P., 1990. Moisissures utiles et nuisibles - Importance industrielle. 2^e édition, Paris, 512 p.
- Brewer, D., Greenwell, M., Taylor, A., 1993. Studies of *Trichoderma* isolates from *Mytilus edulis* collected on the shores of Cape Breton and Prince Edward islands. *Proc. N.S. Inst. Sci.* 40, 29-40.
- Brisou, J., 1975. Les levures et les champignons du milieu marin. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Med.* 4, 159-162.
- Brückner, H., König, W.A., Greiner, M., Jung, G., 1979. The sequences of the membrane-modifying peptide antibiotic Trichotoxin A-40. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 18, 476-477.
- Brückner, H., 1983. Chromatographic and mass spectrometric characterization of the structures of the polypeptide antibiotics samarosporin and stilbellin and identity with emerimicin. *Chromatographia* 17, 679-685.
- Brückner, H., Graf, H., 1983. Paracelsin, a peptide antibiotic containing α -aminoisobutyric acid, isolated from *Trichoderma reesei* Simmons. Part A. *Experientia* 39, 528-530.
- Brückner, H., Graf, H., Bokel, M., 1984. Paracelsin ; characterization by NMR spectroscopy and circular dichroism, and hemolytic properties of a peptaibol antibiotic from the cellulolytically active mold *Trichoderma reesei*. Part B. *Experientia* 40, 1189-1197.
- Brückner, H., Przybylski, M., 1984a. Methods for the rapid detection, isolation and sequence determination of "peptaibols" and other Aib-containing peptides of fungal origin. I. Gliodeliquescin A from *Gliocladium deliquescens*. *Chromatographia* 19, 188-199.
- Brückner, H., Przybylski, M., 1984b. Isolation and structural characterization of polypeptide antibiotics of the peptaibol class by high-performance liquid chromatography with field desorption and fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 296, 263-275.
- Brückner, H., Maisch, J., Reinecke, C., Kimonyo, A., 1991. Use of α -aminoisobutyric acid and isovaline as marker amino acids for the detection of fungal polypeptide antibiotics. *Amino Acids* 1, 251-257.
- Burgess, A.W., Leach, S.J., 1973. An obligatory α -helical amino acid residue. *Biopolymers* 12, 2599-2605.

- Burtseva, Y.V., Verigina, N.S., Sova, V.V., Pivkin, M.V., Zvyagintseva, T.N., 2003. O-Glycosylhydrolases of Marine Filamentous Fungi: β -1,3-Glucanases of *Trichoderma aureviride*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 39, 475-481.
- Cafiso, D., 1994. Alamethicin: a peptide model for voltage gating and protein-membrane interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* 23, 141-165.
- Carr, R.S., Williams, J.W., Fragata, C.T.B., 1989. Development and evaluation of a novel marine sediment pore water toxicity test with polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 533-543.
- Cech, N.B., Enke, C.G., 2001. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* 20, 362-387.
- Chapman, P.M., Long, E.R., 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 14, 81-84.
- Chapman, P.M., Morgan, J.D., 1983. Sediment bioassays with oyster larvae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 438-444.
- Chen, F.-Y., Lee, M.-T., Huang, H.W., 2002. Sigmoidal Concentration Dependence of Antimicrobial Peptide Activities: A Case Study on Alamethicin. *Biophys. J.* 82, 908-914.
- Christophersen, C., Crescente, O., Frisvad, J., Gram, L., Nielsen, J., Nielsen, P., Rahbaek, L., 1999. Antibacterial activity of marine-derived fungi. *Mycopathologia* 143, 135-138.
- Chugh, J.K., Wallace, B.A., 2001. Peptaibols: Models for ion channels. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 565-570.
- Chugh, J.K., Bruckner, H., Wallace, B.A., 2002. Model for a Helical Bundle Channel Based on the High-Resolution Crystal Structure of Trichotoxin_A50E. *Biochemistry* 41, 12934-12941.
- Cole, R.B., Harrata, A.K., 1993. Solvent effect on analyte charge state, signal intensity, and stability in negative ion electrospray mass spectrometry; implications for the mechanism of negative ion formation. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 4, 546-556.
- Cole, R.B., 1997. Electrospray ionization mass spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications. New York, 577 p.
- Comité National de la Conchyliculture, 2006. La conchyliculture française, CNC, Paris, 20 p.
- Connor, P.M., 1972. Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 3, 190-192.

- Cornette, F., Blin, J.L., Ropert, M., Pacary, S., Pien, S., Le Gagneur, E., Kopp, J., Richard, O., 2000. REMONOR: Résultats 2000, IFREMER /DRV/RA/LCN, 30 p.
- Cosette, P., Rebuffat, S., Bodo, B., Molle, G., 1999. The ion-channel activity of longibrachins LGA I and LGB II: effects of Pro-2/Ala and Gln-18/Glu substitutions on the alamethicin voltage-gated membrane channels. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1461, 113-122.
- Cuomo, V., Palomba, I., Perreti, A., Guerriero, A., D'Ambrosio, M., Pietra, F., 1995. Antimicrobial activities from marine fungi. *J. Mar. Biotechnol.* 2, 199-204.
- Das, M., Raghothama, S., Balaram, P., 1986. Membrane channel forming polypeptides. Molecular conformation and mitochondrial uncoupling activity of antiameobin, an α -aminoisobutyric acid containing peptide. *Biochemistry* 25.
- Dathe, M., Kaduk, C., Tachikawa, E., Melzig, M., Wenschuh, H., Bienert, M., 1998. Proline at position 14 of alamethicin is essential for hemolytic activity, catecholamine secretion from chromaffin cells and enhanced metabolic activity in endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1370, 175-183.
- De Hoffmann, E., Stroobant, V., 2005. Spectrométrie de masse. 3^e Edition, Paris, 425 p.
- De Moura Sarquis, M.I., De Oliveira, P.C., 1996. Diversity of microfungi in the sandy soil of Ipanema Beach, Rio de Janeiro, Brazil. *J. Basic Microbiol.* 36, 51-58.
- Degenkolb, T., Heinze, S., Schlegel, B., Dornberger, K., Mollmann, U., Dashe, H.M., Gräfe, U., 2000. Roseoferin, a New Aminolipopeptide Antibiotic Complex from *Mycogone rosea* DSM 12973, Structures and Biological Activities. *J. Antibiot.* 53, 184-190.
- Degenkolb, T., Heinze, S., Schlegel, B., Strobel, G., Gräfe, U., 2002. Formation of new lipoaminopeptides, acremostatins A, B, and C, by co-cultivation of *Acremonium* sp. Tbp-5 and *Mycogone rosea* DSM 12973. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 883-6.
- Degenkolb, T., Berg, A., Gams, W., Schlegel, B., Gräfe, U., 2003. The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *J. Pept. Sci.* 9, 666-678.
- Degenkolb, T., Gräfenham, T., Berg, A., Nirenberg, H., Gams, W., Brückner, H., 2006a. Peptaibiotics: Screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species. *Chem. Biodivers.* 3, 593-610.
- Degenkolb, T., Gräfenhan, T., Nirenberg, H.I., Gams, W., Brückner, H., 2006b. *Trichoderma brevicompactum* complex: Rich source of novel and recurrent plant-protective polypeptide antibiotics (peptaibiotics). *J. Agric. Food Chem.* 54, 7047-7061.

- Denardou, A., 1998. Contribution à l'étude d'un dinoflagellé toxique: *Prorocentrum minimum* et de son incidence sur la toxicité des coquillages cultivés. Développement d'un test biologique de dépistage des neurotoxines. Thèse de Doctorat, Université de Nantes, Nantes, 303 p.
- Di Blasio, B., Pavone, V., Saviano, M., Lombardi, A., Natri, F., Pedone, C., Benedetti, E., Crisma, M., Anzolin, M., Toniolo, C., 1992. Structural characterization of the β -bend ribbon spiral : crystallographic analysis of two long (L-Pro-Aib)_n sequential peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 6273-6278.
- Dornberger, K., Ihn, W., Ritzau, M., Gräfe, U., Schlegel, B., Fleck, W.F., Metzger, J., 1995. Chrysospermins, new peptaibol antibiotics from *Apiocrea chrysosperma* Ap101. *J. Antibiot.* 48, 977-989.
- Duclohier, H., Molle, G., Dugast, J.Y., Spach, G., 1992. Prolines are not essential residues in the "barrel-stave" model for ion channels induced by alamethicin analogues. *Biophys. J.* 63, 868-873.
- Duclohier, H., Snook, C.F., Wallace, B.A., 1998. Antiamoebin can function as a carrier or as a pore-forming peptaibol. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1415, 255-260.
- Duclohier, H., Wroblewski, H., 2001. Voltage-Dependent Pore Formation and Antimicrobial Activity by Alamethicin and Analogues. *J. Membrane Biol.* 184, 1-12.
- Duclohier, H., 2004. Helical kink and channel behaviour: A comparative study with the peptaibols alamethicin, trichotoxin and antiamoebin. *Eur. Biophys. J.* 33, 169-174.
- Duclohier, H., Alder, G., Bashford, C., Brückner, H., Chugh, J.K., Wallace, B.A., 2004. Conductance studies on trichotoxin_A50E and implications for channel structure. *Biophys. J.* 87, 1705-1710.
- Duval, D., Rebuffat, S., Goulard, C., Prigent, Y., Becchi, M., Bodo, B., 1997. Isolation and sequence analysis of the peptide antibiotics trichorzins PA from *Trichoderma harzianum*. *J. Chem. Soc., Perkin trans., I*, 2147-2154.
- Duval, D., Cosette, P., Rebuffat, S., Duclohier, H., Bodo, B., Molle, G., 1998. Alamethicin-like behaviour of new 18-residue peptaibols, trichorzins PA. Role of the C-terminal amino-alcohol in the ion channel forming activity. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1369, 309-319.
- El Hajji, M., Rebuffat, S., Le Doan, T., Klein, G., Satre, M., Bodo, B., 1989. Interaction of trichorzianines A and B with model membranes and with the amoeba *Dictyostelium*. *Biochim. Biophys. Acta* 978, 97-104.
- Epand, R.F., Shai, Y., Segrest, J.P., Anantharamaiah, G.M., 1995. Mechanisms for the modulation of membrane bilayer properties by amphipathic helical peptides. *Biopolymers* 37, 319-338.
- Esposito, G., Carver, J.A., Boyd, J., Campbell, I.D., 1987. High-resolution proton NMR study of the solution structure of alamethicin. *Biochemistry* 26, 1043-1050.

- Favilla, M., Macchia, L., Gallo, A., Altomare, C., 2006. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1922-1931.
- Fichet, D., Radenac, G., Miramand, P., 1998. Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: Bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 509-518.
- Fonteriz, R.I., Lopez, M.G., Garcia-Sancho, J., Garcia, A.G., 1991. Alamethicin channel permeation by Ca^{2+} , Mn^{2+} and Ni^{2+} in bovine chromaffin cells. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 283, 89-92.
- Förstner, U., 1990. Environmental factors controlling the uptake and release of organic and inorganic pollutant burden. In: Alzieu, C., Gallenne, B. (Eds.), Proceedings of the International Seminar on Environmental Aspects of Dredging Activities. Port autonome de Nantes Saint-Nazaire, Nantes, France, pp. 33-47.
- Fox, R., Richards, F., 1982. A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5 Angström resolution. *Nature* 300, 325-330.
- Fredenhagen, A., Molleyres, L., Bohlendorf, B., Laue, G., 2006. Structure determination of neoefrapeptins A to N : peptides with insecticidal activity produced by the fungus *Geotrichum candidum*. *J. Antibiot.* 59, 267-280.
- Fujita, T., Takaishi, Y., Okamura, A., 1981. New peptide antibiotics, trichopolyns I and II, from *Trichoderma polysporum*. *J Chem Soc Chem Comm* 12, 585-587.
- Fujita, T., Wada, S.I., Iida, A., Nishimura, T., Kanai, M., Toyama, N., 1994. Fungal metabolites. XIII. Isolation and structural elucidation of new peptaibols, trichodecenins I and II, from *Trichoderma viride*. *Chem. Pharm. Bull.* 42, 489-494.
- Geffard, O., 2001. Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés: évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux I, Bordeaux, 351 p.
- Geffard, O., His, E., Budzinski, H., Seaman, M., Garrigues, P., 2001. Qualité biologique de l'eau de mer évaluée *in situ* par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*. *C. R. Acad. Sci. III - Vie* 324, 1149-1155.
- Geffard, O., Geffard, A., His, E., Budzinski, H., 2003. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 481-490.

- Geffard, O., His, E., Budzinski, H., Chiffolleau, J.F., Coynel, A., Etcheber, H., 2004. Effects of storage method and duration on the toxicity of marine sediments to embryos of *Crassostrea gigas* oysters. *Environ. Pollut.* 129, 457-465.
- Gibbs, N., Sessions, R.B., Williams, P.B., Dempsey, C.E., 1997. Helix bending in alamethicin: molecular dynamics simulations and amide hydrogen exchange in methanol. *Biophys. J.* 72, 2490-2495.
- Golubic, S., Radtke, G., Campion-Alsumard, T.L., 2005. Endolithic fungi in marine ecosystems. *Trends Microbiol.* 13, 229-235.
- Gonzalez, M.d.C., Herrera, T., Ulloa, M., Hanlin, R.T., 1998. Abundance and diversity of microfungi in three coastal beaches of Mexico. *Mycoscience* 39, 115-121.
- Gordon, L., Haydon, D., 1972. The unit conductance channel of alamethicin. *Biochim. Biophys. Acta* 255, 1014-1018.
- Goulard, C., Hlimi, S., Rebuffat, S., Bodo, B., 1995. Trichorzins HA and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*. I. Fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* 48, 1248-1253.
- Gräfe, U., Ihn, W., Ritzau, M., Schade, W., Stengel, C., Schlegel, B., Fleck, W.F., Künkel, W., Härtl, A., Gutsche, W., 1995. Helioferins; novel antifungal lipopeptides from *Mycogone rosea*: screening, isolation, structures and biological properties. *J. Antibiot.* 48, 126-133.
- Grigoriev, P.A., Berg, A., Schlegel, B., Heinze, S., Gräfe, U., 2002. Formation of anion-selective membrane pores by texenomycin A, a basic lipopeptaibol antibiotic. *J. Antibiot.* 55, 826-828.
- Grigoriev, P.A., Schlegel, B., Kronen, M., Berg, A., Härtl, A., Gräfe, U., 2003. Differences in membrane pore formation by peptaibols. *J. Pept. Sci.* 9, 763-768.
- Gupta, S., Krasnoff, S.B., Roberts, D.W., Renwick, J.A.A., Brinen, L.S., Clardy, J., 1991. Structures of the efrapeptins: potent inhibitors of mitochondrial ATPase from the fungus *Tolypocladium niveum*. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 707-709.
- Gupta, S., Krasnoff, S.B., Roberts, D.W., Renwick, J.A.A., Brinen, L.S., Clardy, J., 1992. Structure of efrapeptins from the fungus *Tolypocladium niveum* : peptide inhibitors of mitochondrial ATPase. *J. Org. Chem.* 57, 2306-2313.
- Hara, T., Kodama, H., Higashimoto, Y., Yamaguchi, H., Jelokhani-Niaraki, M., Ehara, T., Kondo, M., 2001. Side Chain Effect on Ion Channel Characters of Aib Rich Peptides. *J. Biochem.* 130, 749-755.
- He, K., Ludtke, S.J., Heller, W.T., Huang, H.W., 1996a. Mechanism of alamethicin insertion into lipid bilayers. *Biophys. J.* 71, 2669-2679.

- He, K., Ludtke, S.J., Worcester, D.L., Huang, H.W., 1996b. Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophys. J.* 70, 2659-2666.
- Heinze, S., Ritzau, M., Ihn, W., Hüllsman, H., Schlegel, B., Dornberger, K., Fleck, W.F., Zerlin, M., Christner, C., Gräfe, U., Küllertz, G., Fischer, G., 1997. Lypohexin, a new inhibitor of propyl endopeptidase from *Moeszia lindtneri* (HKI-0054) and *Paecilomyces* sp. (HKI-0055; HKI-0096). I- Screening, isolation and structure elucidation. *J. Antibiot.* 50, 379-383.
- Heller, W.T., He, K., Ludtke, S.J., Harroun, T.A., Huang, H.W., 1997. Effect of changing the size of lipid headgroup on peptide insertion into membranes. *Biophys. J.* 73, 239-244.
- His, E., Seaman, M.N.L., Beiras, R., 1997. A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Wat. Res.* 31, 351-355.
- His, E., Beira, R., Seaman, M.N.L., 1999a. The assessment of marine pollution: bioassays with bivalve embryos and larvae. *Adv. Mar. Biol.* 37, 1-178.
- His, E., Heyvang, I., Geffard, O., De Montaudouin, X., 1999b. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Wat. Res.* 33, 1706-1718.
- Hlimi, S., Rebuffat, S., Goulard, C., Duchamp, S., Bodo, B., 1995. Trichorzins HA and MA, antibiotics peptides from *Trichoderma harzianum*. II. Sequence determination. *J. Antibiot.* 48, 1254-1261.
- Hlimi, S., 1997. Peptides antibiotiques d'origine fongique. Isolement de nouveaux peptaibols, études structurales, relations structure / activités membranaire et antibiotique. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, Paris, 190 p.
- Hou, C.T., Ciegler, A., Hesseltine, C.W., 1972. New mycotoxin, trichotoxin A, from *Trichoderma viride* isolated from southern leaf blight-infected corn. *Appl. Microbiol.* 23, 183-185.
- Huang, H.W., 2000. Action of Antimicrobial Peptides: Two-State Model. *Biochemistry* 39, 8347-8352.
- Huang, Q., Tezuka, Y., Hatanaka, Y., Kikuchi, T., Nishi, A., Tubaki, K., 1995. Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. IV. Minor peptaibols of *Trichoderma koningii*. *Chem. Pharm. Bull.* 43, 1663-1667.
- Huang, Q., Tezuka, Y., Hatanaka, Y., Kikuchi, T., Nishi, A., Tubaki, K., 1996. Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. V. Ion-spray ionization mass spectrometric analysis of trichokonin-II, a peptaibol mixture obtained from the culture broth of *Trichoderma koningii*. *Chem. Pharm. Bull.* 44, 590-593.
- Hüllsman, H., Heinze, S., Ritzau, M., Schlegel, B., Gräfe, U., 1998. Isolation and structure of peptaibolin, a new peptaibol from *Sepedonium* strains. *J. Antibiot.* 51, 1055-1058.

Iida, A., Okuda, M., Uesato, S., Takaishi, Y., Shingu, T., Morita, M., Fujita, T., 1990. Fungal metabolites. Part 3. Structural elucidation of antibiotic peptides, trichosporin-B-IIIb, -IIIc, -IVb, -IVc, -IVd, -VIa and -VIb from *Trichoderma polysporum*. Application of fast-atom bombardment mass spectrometry/mass spectrometry to peptides containing a unique Aib-Pro peptide bond. *J. Chem. Soc., Perkin trans., I*, 3249-3255.

Iida, A., Sanekata, M., Fujita, T., Tanaka, H., Enoky, A., Fuse, G., Kanai, M., Rudewicz, P., Tachikawa, E., 1994. Fungal metabolites. XVI. Structures of new peptaibols, trichokindins I-VII, from the fungus *Trichoderma harzianum*. *Chem. Pharm. Bull.* 42, 1070-1075.

Iida, A., Sanekata, M., Wada, S.I., Fujita, T., Tanaka, H., Enoky, A., Fuse, G., Kanai, M., Asami, K., 1995. Fungal metabolites. XVIII. New membrane-modifying peptides, Trichorozins I-IV, from the fungus *Trichoderma harzianum*. *Chem. Pharm. Bull.* 43, 392-397.

Iida, A., Mihara, T., Fujita, T., Takaishi, Y., 1999. Peptidic immunosuppressants from the fungus *Trichoderma polysporum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 3393-3396.

Iida, J., Iida, A., Takahashi, Y., Takaishi, Y., Nagaoka, Y., Fujita, T., 1993. Fungal metabolites. Part 5. Rapid structure elucidation of antibiotic peptides, minor components of Trichosporin Bs from *Trichoderma polysporum*. Application of linked-scan and continuous-flow fast-atom bombardment mass spectrometry. *J. Chem. Soc., Perkin trans., I*, 357-365.

Ishiyama, D., Satou, T., Senda, H., Fujimaki, T., Honda, R., Kanazawa, S., 2000. Heptaibin, a Novel Antifungal Peptaibol Antibiotic from *Emericellopsis* sp. BAUA8289. *J. Antibiot.* 53, 728-732.

Jaworski, A., Brückner, H., 1999. Detection of new sequences of peptaibol antibiotics trichotoxins A-40 by on-line liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 862, 179-189.

Jaworski, A., Kirschbaum, J., Brückner, H., 1999. Structures of trichovirins II, peptaibol antibiotics from the mold *Trichoderma viride* NRRL 5243. *J. Pept. Sci.* 5, 341-351.

Jaworski, A., Brückner, H., 2000. New sequences and new fungal producers of peptaibol antibiotics antiamoebins. *J. Pept. Sci.* 6, 149-167.

Jaworski, A., Brückner, H., 2001. Sequences of polypeptide antibiotics stilboflavins, natural peptaibol libraries of the mold *Stilbella flavipes*. *J. Pept. Sci.* 7, 433-447.

Kaduk, C., Duclouhier, H., Dathe, M., Wenschuh, H., Beyermann, M., Molle, G., Bienert, M., 1997. Influence of proline position upon the ion channel activity of alamethicin. *Biophys. J.* 72, 2151-2159.

Karle, I.L., Balaram, P., 1990. Structural characteristics of α -helical peptide molecules containing Aib residues. *Biochemistry* 29, 6747-6756.

- Khudyakova, Y., Pivkin, M., Kuznetsova, T., Svetashev, V., 2000. Fungi in sediments of the sea of Japan and their biologically active metabolites. *Microbiology* 69, 608-611.
- Kirschbaum, J., Krause, C., Winzheimer, R.K., Brückner, H., 2003. Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled. *J. Pept. Sci.* 9, 799-809.
- Kitagawa, I., Tachikawa, E., Kashimoto, T., Nagaoka, Y., Iida, A., Fujita, T., 1998. Asymmetrical membrane fluidity of bovine adrenal chromaffin cells and granules and effect of trichosporin-B-VIa. *Biochim. Biophys. Acta* 1375, 93-100.
- Kleinhauß, H., Dörhen, H., 1990. Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur. J. Biochem.* 192, 1-15.
- Kohlmeyer, J., Kohlmeyer, E., 1979. Marine mycology : the higher fungi. Academic Press Ed, New York, 690 p.
- Krause, C., Kirschbaum, J., Brückner, H., 2006a. Peptaibiotics: An advanced, rapid and selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS. *Amino Acids* 30, 435-443.
- Krause, C., Kirschbaum, J., Jung, G., Brückner, H., 2006b. Sequence diversity of the peptaibol antibiotic suzukacillin-A from the mold *Trichoderma viride*. *J. Pept. Sci.* 12, 321-327.
- Kronen, M., Kleinwachter, P., Schlegel, Albert, H., Gräfe, U., 2001. Ampullosporins B, C, D, E1, E2, E3 and E4 from *Sepedonium ampullosporum* HKI-0053: Structures and Biological Activities. *J. Antibiot.* 54, 175-178.
- Kropacheva, T.N., Raap, J., 2002. Ion transport across a phospholipid membrane mediated by the peptide trichogin GA IV. *Biochim. Biophys. Acta* 1567, 193-203.
- Kropacheva, T.N., Salnikov, E.S., Nguyen, H.H., Reissmann, S., Yakimenko, Z.A., Tagaev, A.A., Ovchinnikova, T.V., Raap, J., 2005. Membrane association and activity of 15/16-membered peptide antibiotics: Zervamicin IIB, ampullosporin A and anti amoebin I. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1715, 6-18.
- Landreau, A., 2001. Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii* Oudemans isolée du milieu marin: Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture, Thèse de doctorat de l'Université de Nantes, 201 p.
- Landreau, A., Pouchus, Y.F., Biard, J.F., Sallenave-Namont, C., Robiou du Pont, T., Verbist, J.F., 2002. Combined use of LC/MS and biological test during rapid identification of marine mycotoxins produced by *Trichoderma koningii*. *J. Microbiol. Meth.* 48, 181-194.
- Landy, E.T., Jones, G.M., 2006. What is the Fungal Diversity of Marine Ecosystems in Europe? *Mycologist* 20, 15-21.

- Leclerc, G., Rebuffat, S., Bodo, B., 1998a. Directed biosynthesis of peptaibol antibiotics in two *Trichoderma* strains. II .Structure elucidation. *J. Antibiot.* 51, 178-183.
- Leclerc, G., Rebuffat, S., Goulard, C., Bodo, B., 1998b. Directed biosynthesis of peptaibol antibiotics in two *Trichoderma* strains. I. Fermentation and isolation. *J. Antibiot.* 51, 170-177.
- Leclerc, G., Goulard, C., Prigent, Y., Bodo, B., Wroblewski, H., Rebuffat, S., 2001. Sequences and antimycoplamic properties of longibrachins LGB II and LGB III, two novel 20-residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Nat. Prod.* 64, 164-170.
- Lee, S.-J., Yeo, W.-H., Yun, B.-S., Yoo, I.-D., 1999a. Isolation and sequence analysis of new peptaibol, boletusin, from *Boletus* spp. *J. Pept. Sci.* 5, 374-378.
- Lee, S.-J., Yun, B.-S., Cho, D.-Y., Yoo, I.-D., 1999b. Tylopeptins A and B, New Antibiotic Peptides from *Tylophilus neofelleus*. *J. Antibiot.* 52, 998-1006.
- Lee, S.M., Li, X.F., Jiang, H., Cheng, J.G., Seong, S., Choi, H.D., Son, B.W., 2003. Terreusinone, a novel UV-A protecting dipyrroloquinone from the marine algicolous fungus *Aspergillus terreus*. *Tetrahedron Lett.* 44, 7707-7710.
- Lipmann, F., 1973. Nonribosomal polypeptide synthesis on polyenzyme templates. *Acc. Chem. Res.* 6, 361-367.
- Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B., Kubicek, C.P., 1996. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* 178, 6382-6385.
- Lucaciu, M., Rebuffat, S., Goulard, C., Duclouhier, H., Molle, G., Bodo, B., 1997. Interaction of the 14-residue peptaibols, harzianins HC, with lipid bilayers: permeability modifications and conductance properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1323, 85-96.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., Mootz, H.D., 1997. Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem. Rev.* 97, 2651-2674.
- Marsh, D., 1996. Peptide models for membrane channels. *Biochem. J.* 315, 345-361.
- Marsh, D., Jost, M., Peggion, C., Toniolo, C., 2007. Lipid chainlength dependence for incorporation of alamethicin in membranes: EPR studies on TOAC-spin labelled analogues. *Biophys. J.*
- Martin, D.R., Williams, R.J.P., 1976. The nature and function of alamethicin. *Biochem. J.* 153.
- Martin, M., Osborn, K.E., Billig, P., Glickstein, N., 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 12, 305-308.

- Matha, V., Jegorov, A., Kiess, M., Brückner, H., 1992. Morphological alterations accompanying the effect of peptaibiotics, alpha-aminoisobutyric acid-rich secondary metabolites of filamentous fungi, on *Culex pipiens* larvae. *Tissue Cell* 24, 559-564.
- Matsuura, K., Yesilada, A., Iida, A., Takaishi, Y., Kanai, M., Fujita, T., 1993. Fungal metabolites. Part 8. Primary structures of antibiotic peptides, hypelcin A-I, A-II, A-III, A-IV, A-V, A-VI, A-VII, A-VIII and A-IX from *Hypocrea peltata*. *J. Chem. Soc., Perkin trans., I* 3, 381-387.
- Matsuura, K., Shima, T., Takaishi, Y., Nagaoka, Y., Fujita, T., 1994. Fungal metabolites XV. Primary structures of antibiotic peptides, hypelcins B-I, B-II, B-III, B-IV and B V, from *Hypocrea peltata*. Application of electrospray mass spectrometry and electrospray mass spectrometry/mass spectrometry. *Chem. Pharm. Bull.* 42, 1063-1069.
- McClanahan, T.R., McLaughlin, S.M., Davy, J.E., Wilson, W.H., Peters, E.C., Price, K.L., Maina, J., 2004. Observations of a new source of coral mortality along the Kenyan coast. *Hydrobiologia* 530-531, 469-479.
- Melling, J., McMullen, A., 1975. Separation, purification and characterisation of alamethicins produced from *Trichoderma viride*. *ISC-IAMS Proc. Science Council of Japan* 5, 446-452.
- Melzian, B.D., 1990. Toxicity assessment of dredged materials: acute and chronic toxicity as determined by bioassays and bioaccumulation tests. In: Alzieu, C., Gallenne, B. (Eds.), Proceedings of the International Seminar on Environmental Aspects of Dredging Activities. Port autonome de Nantes Saint-Nazaire, Nantes, France, pp. 49-64.
- Meyer, C.E., Reusser, F., 1967. A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*. *Experientia* 23, 85-86.
- Miao, L., Qian, P.Y., 2005. Antagonist antimicrobial activity of marine fungi and bacteria isolated from marine biofilm and seawaters of Hong-Kong. *Aquat. Microb. Ecol.* 38, 231-238.
- Mohamed-Benkada, M., 2006. Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles: substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*, Université de Nantes, 140 p.
- Mohamed-Benkada, M., Montagu, M., Biard, J.F., Mondeguer, F., Vérité, P., Dalgalarondo, M., Bissett, J., Pouchus, Y.F., 2006. New short peptaibols from a marine *Trichoderma* strain. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 1176-1180.
- Molle, G., Duclouhier, H., Spach, G., 1987. Voltage-dependent and multi-state ionic channels induced by trichorzianines, anti-fungal peptides related to alamethicin. *FEBS Lett.* 224, 208-212.
- Mottamal, M., Lazaridis, T., 2006. Voltage-dependent energetics of alamethicins monomers in the membrane. *Biophys. Chem.* 122, 50-57.

- Nagaoka, Y., Iida, A., Tachikawa, E., Fujita, T., 1995. Fungal metabolites. XX. Effect of proline residue on the structure of ion-channel-forming peptide, trichosporin B-VIa. *Chem. Pharm. Bull.* 43, 1119-1124.
- New, A., Eckers, C., Haskins, N.J., Neville, W.A., Elson, S., Hueso-Rodriguez, J.A., Rivera-Sagredo, A., 1996. Structures of polysporins A-D, four new peptaibols isolated from *Trichoderma polysporum*. *Tetrahedron Lett.* 37, 3039-3042.
- Nir-Paz, R., Prevost, M.-C., Nicolas, P., Blanchard, A., Wroblewski, H., 2002. Susceptibilities of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma hyorhinis* to Membrane-Active Peptides and Enrofloxacin in Human Tissue Cell Cultures
10.1128/AAC.46.5.1218-1225.2002. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1218-1225.
- Numata, A., Takahashi, C., Ito, Y., Takada, T., Kawai, K., Usami, Y., Matsumura, E., Imachi, M., Ito, T., Hasegawa, T., 1993. Communesins, cytotoxic metabolites of a fungus isolated from a marine alga. *Tetrahedron Lett.* 34, 2355-2358.
- Oh, S., Yun, B., Lee, S., Kim, J., Yoo, I., 2000. Structural elucidation of new antibiotic peptides, atroviridins A, B and C from *Trichoderma atroviride*. *Tetrahedron Lett.* 41, 61-64.
- Oh, S., Yun, B., Lee, S., Kim, J., Yoo, I., 2002. Atoviridins A-C and neoatroviridins A-D, novel peptaibol antibiotics produced by *Trichoderma atroviride* F80317. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* 55, 557-564.
- Oh, S.U., Yun, B.S., Lee, S.J., Yoo, I.D., 2005. Structures and biological activities of novel antibiotic peptaibols neoatroviridins A-D from *Trichoderma atroviride* F80317. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15, 384-387.
- Okuda, M., Iida, A., Uesato, S., Nagaoka, Y., Fujita, T., Takaishi, Y., Terada, H., 1994. Fungal metabolites. X. The effect of peptide antibiotics, trichosporin-Bs, on the respiratory activity of mitochondria. *Bio. Pharm. Bull.* 17, 482-485.
- Oliynyk, V., Kaatze, U., Heimburg, T., 2007. Defect formation of lytic peptides in lipid membranes and their influence on the thermodynamic properties of the pore environment. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1768, 236-245.
- O'Reilly, A.O., Wallace, B.A., 2003. The peptaibol antiameobin as a model ion channel: similarities to bacterial potassium channels. *J. Pept. Sci.* 9, 769-775.
- Ovchinnikova, T.V., Levitskaya, N.G., Voskresenskaya, O.G., Yakimenko, Z.A., Tagaev, A.A., Ovchinnikova, A.Y., Murashev, A.N., Kamenskii, A.A., 2007. Neuroleptic properties of the ion-channel-forming peptaibol zervamicin : locomotor activity and behavioral effects. *Chem. Biodivers.* 4, 1374-1387.

- Pandey, R.C., Cook, J.C., Rinehart, K.L., 1977a. High resolution and field desorption mass spectrometry studies and revised structures of alamethicins I and II. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 8469-8483.
- Pandey, R.C., Meng, H., Cook, J.C., Rinehart, K.L., 1977b. Structure of anti amoebin I from high resolution field desorption and gas chromatographic mass spectrometry studies. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 5203-5205.
- Payne, J.W., Jakes, R., Hartley, B.S., 1970. The primary structure of alamethicin. *Biochem. J.* 117, 757-766.
- Peltola, J., Ritieni, A., Mikkola, R., Grigoriev, P.A., Pocsfalvi, G., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., 2004. Biological effects of *Trichoderma harzianum* peptaibols on mammalian cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4996-5004.
- Poirier, L., Amiard, J.C., Mondeguer, F., Quiniou, F., Ruiz, N., Pouchus, Y.F., Montagu, M., 2007a. Determination of peptaibol trace amounts in marine sediments by liquid chromatography / electrospray ionization - ion trap - mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1160, 106-113.
- Poirier, L., Montagu, M., Landreau, A., Mohamed-Benkada, M., Grovel, O., Sallenave-Namont, C., Biard, J.-F., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Pouchus, Y.F., 2007b. Peptaibols: stable markers of fungal development in the marine environment. *Chem. Biodivers.* 4, 1116-1128.
- Psurek, A., Neusüß, C., Pelzing, M., Scriba, G.K.E., 2005. Analysis of the lipophilic peptaibol alamethicin by nonaqueous capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 26, 4368-4378.
- Psurek, A., Neusüß, C., Degenkolb, T., Brückner, H., Balaguer, E., Imhof, D., Scriba, G.K.E., 2006. Detection of new amino acid sequences of alamethicins F30 by nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Pept. Sci.* 12, 279-290.
- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., 2005. Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux : bio-essai "développement embryon-larvaire de bivalve". In: Ifremer (Ed.), Méthodes d'analyse en milieu marin, pp. 24.
- Raap, J., Erkelens, K., Ogrel, A., Skladnev, D.A., Brückner, H., 2005. Fungal biosynthesis of non-ribosomal peptide antibiotics and α,α -dialkylated amino acid constituents. *J. Pept. Sci.* 11, 331-338.
- Radics, L., Katjar-Peredy, M., Casinovi, C.G., Rossi, C., Ricci, M., Tuttobello, L., 1987. Leucinostatins H and K, two novel peptide antibiotics with tertiary amine-oxide terminal group from *Paecylomices marquandii* : Isolation, structure and biological activity. *J. Antibiot.* , 714-716.

- Rebuffat, S., El Hajji, M., Hennig, P., Davoust, D., Bodo, B., 1989. Isolation, sequence and conformation of seven trichorzianines B from *Trichoderma harzianum*. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 34, 200-210.
- Rebuffat, S., Prigent, Y., Auvin-Guette, C., Bodo, B., 1991. Tricholongins BI and BII, 19-residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. Solution structure from two-dimensional NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 201, 661-674.
- Rebuffat, S., Conraux, L., Massias, M., Auvin-Guette, C., Bodo, B., 1993. Sequence and solution conformation of the 20-residue peptaibols, saturnisporins SA II and SA IV. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 41, 74-84.
- Rebuffat, S., Goulard, C., Bodo, B., 1995. Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*: harzianins HC proline-rich 14-residue peptaibols. *J. Chem. Soc., Perkin trans., I*, 1849-1855.
- Rebuffat, S., Hlimi, S., Prigent, Y., Goulard, C., Bodo, B., 1996. Isolation and structural elucidation of the 11-residue peptaibol antibiotic, harzianin HK VI. *J. Chem. Soc., Perkin trans., I* 16, 2021-2027.
- Rebuffat, S., Goulard, C., Bodo, B., Roquebert, M.F., 1999. The peptaibol antibiotics from *Trichoderma* soil fungi; structural diversity and membrane properties. *Recent Res. Devel. Org. Bioorg. Chem.* 3, 65-91.
- Rebuffat, S., Goulard, C., Hlimi, S., Bodo, B., 2000. Two unprecedented natural Aib-peptides with the (Xaa-Yaa-Aib-Pro) motif and an unusual C-terminus: Structures, membrane-modifying and antibacterial properties of pseudokonins KL III and KL VI from the fungus *Trichoderma pseudokoningii*. *J. Pept. Sci.* 6, 519-533.
- Reculeau, X., 2003. Production et étude de toxicité des peptaïbols d'une souche marine de *Trichoderma koningii*, Université de Nantes, Nantes, 42 p.
- Rees, G., Jones, E.B.G., 1985. The fungi of a coastal sand dune system. *Bot. Mar.* 28, 213-220.
- Reiber, K., Neuhof, T., Ozegowski, J.H., Von Döhren, H., Schwecke, T., 2003. A nonribosomal peptide synthetase involved in the biosynthesis of ampullosporins in *Sepedonium ampullosporun*. *J. Pept. Sci.* 9, 701-713.
- Rinehart, K.L., Gaudioso, L.A., Moore, M.L., Pandey, R.C., Cook, J.C., Barber, M., Sedgwick, R.D., Bordoli, R.S., Tyler, A.N., Green, B.N., 1981. Structures of eleven zervamicin and two emerimicin peptide antibiotics studied by fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 6517-6520.
- Ritieni, A., Fogliano, V., Nanno, D., Randazzo, G., Altomare, C., Perrone, G., Bottalico, A., Maddau, L., Marras, F., 1995. Paracelsin E, a new peptaibol from *Trichoderma saturnisporum*. *J. Nat. Prod.* 58, 1745-1748.

- Ritzau, M., Heinze, S., Dornberger, K., Berg, A., Fleck, W.F., Schlegel, B., Härh, A., Gräfe, U., 1997. Ampullosporin, a new peptaibol-type antibiotic from *Sepedonium ampullosporum* HKI-0053 with neuroleptic activity in mice. *J. Antibiot.* 50, 722-728.
- Roepstorff, P., Fohlman, J., 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions mass in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 11, 601.
- Ruiz, N., 2007. Micromycètes et métabolites fongiques en milieu marin - Isolement de souches - Mise en culture - Production, identification et évaluation pharmacologique de lipides, acides gras et peptides. Thèse de Doctorat, Université de Nantes, Nantes, 283 p.
- Ruiz, N., Wielgosz-Collin, G., Poirier, L., Grovel, O., Petit, K., Mohammed-Benkada, M., Robiou du Pont, T., Bisset, J., Barnathan, G., Pouchus, Y.-F., 2007. New trichobrachins, 11-residue peptaibols from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*. *Peptides*, sous presse.
- Sabareesh, V., Balaram, P., 2006. Tandem electrospray mass spectrometric studies of proton and sodium ion adducts of neutral peptides with modified N- and C-termini : Synthetic model peptides and microheterogeneous peptaibol antibiotics. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 618-628.
- Sallenave, C., 1999. Etude de la flore fongique des zones conchyliques de l'estuaire de la Loire. Recherche de souches toxigènes, Nantes, 194 p.
- Sallenave-Namont, C., Pouchus, Y.F., Bardouil, M., Lassus, P., Roquebert, M.F., Verbist, J.F., 1999. Bioaccumulation of mycotoxins by shellfish : Contamination of mussels by metabolites of a *Trichoderma koningii* strain isolated in the marine environment. *Toxicon* 37, 77-83.
- Sallenave-Namont, C., Pouchus, Y.F., Robiou du Pont, T., Lassus, P., Verbist, J.F., 2000. Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. *Mycopathologia* 149, 21-25.
- Samuels, G., 1996. *Trichoderma* : a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100, 923-935.
- Sansom, M., 1993. Structure and function of channel-forming peptaibols. *Q. Rev. Biophys.* 26, 365-421.
- Sato, H., Feix, J.B., 2006. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1758, 1245-1256.
- Schiell, M., Hofmann, J., Kurz, M., Schmidt, F.R., Vértessy, L., Vogel, M., Wink, J., Seibert, G., 2001. Cephaibols, new peptaibol antibiotics with anthelmintic properties from *Acremonium tubakii* DSM 12774. *J. Antibiot.* 54, 220-233.
- Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E., Kubicek, C.P., 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics,

molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4364-4370.

Ségalas, I., Prigent, Y., Davoust, D., Bodo, B., Rebuffat, S., 1999. Characterization of a type of β -bend ribbon spiral generated by the repeating (Xaa-Yaa-Aib-Pro) motif : The solution structure of harzianin HC IX, a 14-residue peptaibol forming voltage-dependent ion channels. *Biopolymers* 50, 71-85.

Sharman, G.J., Try, A.C., Williams, D.H., Ainsworth, A.M., Beneyto, R., Gibson, T.M., McNicholas, C., Renno, D.V., Robinson, N., Wood, K.A., Wrigley, S.K., 1996. Structural elucidation of XR586, a peptaibol-like antibiotic from *Acremonium persicinum*. *Biochem. J.* 320, 723-728.

Shaumann, K., 1993. Marine pilze. In: Meyer-Reil, L.A., Köster, M.G.F. (Eds.), *Mikrobiologie des meeresbodens*, pp. 144-195.

Shumway, S.E., Cucci, T.L., 1987. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs. *Aquat. Toxicol.* 10, 9-27.

Sigma, 2004. Alamethicin from *Trichoderma viride* - Product information, Sigma-Aldrich, Inc, Saint Louis.

Solfrizzo, M., Altomare, C., Visconti, A., Bottalico, A., Giancarlo, P., 1994. Detection of peptaibols and their hydrolysis products in cultures of *Trichoderma* species. *Nat. Toxins* 2, 360-365.

Sornin, J., Feuillet-Girard, M., Héral, M., Deslous-Paoli, J., 1983. Effet des biodépôts de l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg) sur l'accumulation de matières organiques dans les parcs du bassin de Marennes-Oléron. *J. Moll. Stud.* 49.

Sponga, F., Cavaletti, L., Lazzarini, A., Borghi, A., Ciciliato, I., Losi, D., Marinelli, F., 1999. Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms. *J. Biotechnol.* 70, 65-69.

Sze, P.W.C., Lee, S.Y., 1995. The potential role of mucus in the depuration of copper from the mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann). *Mar. Pollut. Bull.* 31, 390-393.

Szekeres, A., Leitgeb, B., Kredics, L., Antal, Z., Hatvani, L., Manczinger, L., Vagvölgyi, C., 2005. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*: A review. *Acta Microbiol. Immunol.* 52, 137-168.

Tachikawa, E., Takahashi, S., Furumachi, K., Kashimoto, T., Iida, A., Nagaoka, Y., Fujita, T., Takaishi, Y., 1991. Trichosporin-B-III, an α -aminoisobutyric acid-containing peptide, causes Ca^{2+} -dependent catecholamine secretion from adrenal medullary chromaffin cells. *Mol. Pharmacol.* 40, 790-797.

Tachikawa, E., Nogimori, K., Takahashi, S., Mizuma, K., Itoh, K., Kashimoto, T., Nagaoka, Y., Iida, A., Fujita, T., 1996. Pathway for Ca^{2+} influx into cells by trichosporin-B-VIa, an α -aminoisobutyric acid-containing peptide, from the fungus *Trichoderma polysporum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1282, 140-148.

- Takahashi, C., Numata, A., Yamada, T., Minoura, K., Enomoto, S., Konishi, K., Nakai, M., Matsuda, C., Nomoto, K., 1996. Penostatins, novel cytotoxic metabolites from a *Penicillium* species separated from a green alga. *Tetrahedron Lett.* 37, 655-658.
- Takaishi, Y., Terada, H., Fujita, T., 1980. The effect of two new peptide antibiotics, the hypelcins, on mitochondrial function. *Experientia* 36, 550-551.
- Taylor, P.J., 2005. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 38, 328-334.
- Thebault, A., 2001. Epidémiologie dans le cadre de mortalités anormales de coquillages : exemple des coques du Croisic, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maison-Alfort.
- Thirumalachar, M.J., 1968. Antiamoebin, a new antiprotozoal and anthelmintic antibiotic. I. Production and biological studies. *Hindustan Antibiot. Bull.* 10, 287-289.
- Tieleman, D.P., Berendsen, H.J.C., Sansom, M.S.P., 2001. Voltage-dependent insertion of alamethicin at phospholipid/water and octane/water interfaces. *Biophys. J.* 80, 331-346.
- Toniolo, C., Bonora, G.M., Bavoso, A., Benedetti, E., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., 1983. Preferred conformations of peptides containing α,α -disubstituted α -amino acids. *Biopolymers* 22, 205-215.
- Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F., Peggion, C., Epanand, R.F., Epanand, R.M., 2001. Lipopeptaibols, a novel family of membrane active, antimicrobial peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1179-1188.
- Tsantrizos, Y.S., Pischos, S., Sauriol, F., Widden, P., 1996. Peptaibol metabolites of *Tolypocladium geodes*. *Can. J. Chem.* 74, 165-172.
- Vial, J., Jardy, A., 1999. Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC method. *Anal. Chem.* 71, 2672-2677.
- Vitkova, V., Méléard, P., Pott, T., Bivas, I., 2006. Alamethicin influence on the membrane bending elasticity. *Eur. Biophys. J.* 35, 281-286.
- Vizcaino, J.A., Sanz, L., Cardoza, R.E., Monte, E., Gutiérrez, S., 2005. Detection of putative peptide synthetase genes in *Trichoderma* species: Application of this method to the cloning of a gene from *T. harzianum* CECT 2413. *FEMS Microbiol. Lett.* 244, 139-148.
- Von Döhren, H., Keller, U., Vater, J., Zocher, R., 1997. Multifunctional Peptide Synthetases. *Chem. Rev.* 97, 2675-2706.

- Wada, S.I., Iida, A., Akimoto, N., Kanai, M., Toyama, N., Fujita, T., 1995. Fungal metabolites. XIX. Structural elucidation of channel-forming peptides, Trichorovins - I-XIV, from the fungus *Trichoderma viridae*. *Chem. Pharm. Bull.* 43, 910-915.
- Wada, S.I., Iida, A., Asami, K., Tachikawa, E., Fujita, T., 1997. Role of the Gln/Glu residues of trichocellins A-II/B-II in ion-channel formation in lipid membranes and catecholamine secretion from chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1325, 209-214.
- Wada, S.-I., Nishimura, T., Iida, A., Toyama, N., Fujita, T., 1994. Primary structures of antibiotic peptides, trichocellins-A and -B from *Trichoderma viride*. *Tetrahedron Lett.* 35, 3095-3098.
- Wada, S.-I., Iida, A., Asami, K., Fujita, T., 1996. Ion channel-forming property of trichorovin-XII, an 11-residue peptaibol from the fungus *Trichoderma viride*, in planar lipid bilayer membranes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6, 2275-2278.
- Wei, X., Yang, F., Straney, D.C., 2005. Multiple non-ribosomal peptide synthetase genes determine peptaibol synthesis in *Trichoderma virens*. *Can. J. Microbiol.* 51, 423-429.
- Whitmore, L., Chugh, J.K., Snook, C.F., Wallace, B.A., 2003. The peptaibol database: A sequence and structure resource. *J. Pept. Sci.* 9, 663-665.
- Whitmore, L., Wallace, B.A., 2004. The Peptaibol Database: A database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. *Nucleic Acids Res.* 32, 593-594.
- Wiest, A., Grzegorski, D., Xu, B.-W., Goulard, C., Rebuffat, S., Ebbole, D.J., Bodo, B., Kenerley, C., 2002. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J. Biol. Chem.* 277, 20862-20868.
- Wilhelm, C., Anke, H., Flores, Y., Sterner, O., 2004. New Peptaibols from *Mycogone cervina*. *J. Nat. Prod.* 67, 466-468.
- Woelke, C.H., 1972. Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48 hours Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo, Washington Department of Fisheries, 1-93 p.
- Wright Steele, K., 1967. Fungus populations in marine waters and coastal sands of the Hawaiian line and Phoenix Islands Pacific. *Pac. Sci.* 23, 317-331.
- Xiao-Yan, S., Qing-Tao, S., Shu-Tao, X., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S., Yu-Zhong, Z., 2006. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 260, 119-125.
- Yee, A.A., Babiuk, R., O'Neil, J.D.J., 1995. The conformation of an alamethicin in methanol by multinuclear NMR spectroscopy and distance geometry/simulated annealing. *Biopolymers* 36, 781-792.

Yee, A.A., Szymczyna, B., O'Neil, J.D.J., 1999. Backbone dynamics of detergent-solubilized alamethicin from amide hydrogen exchange measurements. *Biochemistry* 38, 6489-6498.

Yun, B.S., Yoo, I.D., Kim, Y.H., Kim, Y.S., Lee, S.J., Kim, K.S., Yeo, W.H., 2000. Peptavirins A and B, two new antiviral peptaibols against TMV infection. *Tetrahedron Lett.* 41, 1429-1431.

Annexes

Annexe 1 : Peptaïbols à longue séquence : Origine, séquence, masse moléculaire calculée (M) et valeur théorique du rapport m/z du bichargé sodium.

Ac = acétyl, Aol = Alaninol, Fol = Phénylalaninol, Iol = Isoleucinol, Jol = Isovalinol, Lol = Leucinol, Lx = Leucine/Isoleucine, Lxol = Leucinol/Isoleucinol, Sol = Sérinol, Uol = Acide α -aminoisobutanol, Vol = Valinol, Vx = Valine/Isovaline, Vxol = Valinol/Isovalinol, Wol = Tryptophanol.
(en date du 1^{er} mai 2007)

Nom	Isolé de	Position																			M (Da)	[M+2Na] ²⁺ m/z	Source bibliographique
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			
Hypomurocin_B_I	<i>Hypocrea muroiana</i>	Ac	U	S	A	L	U	Q	U	V	U	G	U	U	P	L	U	U	Q	Vol	1718,5	882,2	(Becker <i>et al.</i> , 1997)
Hypomurocin_B_II	<i>Hypocrea muroiana</i>	Ac	U	S	A	L	U	Q	U	V	U	G	U	U	P	L	U	U	Q	Lol	1732,5	889,2	(Becker <i>et al.</i> , 1997)
Hypomurocin_B_IIIa	<i>Hypocrea muroiana</i>	Ac	U	A	A	L	U	Q	U	V	U	G	U	U	P	L	U	U	Q	Vol	1702,5	874,3	(Becker <i>et al.</i> , 1997)
Hypomurocin_B_IIIb	<i>Hypocrea muroiana</i>	Ac	U	S	A	L	U	Q	J	V	U	G	U	U	P	L	U	U	Q	Vol	1732,6	889,3	(Becker <i>et al.</i> , 1997)
Hypomurocin_B_IV	<i>Hypocrea muroiana</i>	Ac	U	S	A	L	U	Q	U	V	U	G	J	U	P	L	U	U	Q	Vol	1732,6	889,3	(Becker <i>et al.</i> , 1997)
Hypomurocin_B_V	<i>Hypocrea muroiana</i>	Ac	U	S	A	L	U	Q	U	V	U	G	J	U	P	L	U	U	Q	Lol	1746,6	896,3	(Becker <i>et al.</i> , 1997)
Neotroviridin_A	<i>Trichoderma atroviride</i>	Ac	U	G	A	L	U	Q	U	L	U	G	J	U	P	L	U	U	Q	Lxol	1730,6	888,3	(Oh <i>et al.</i> , 2005)
Neotroviridin_B	<i>Trichoderma atroviride</i>	Ac	U	G	A	L	J	Q	U	L	U	G	J	U	P	L	U	U	Q	Lxol	1744,6	895,3	(Oh <i>et al.</i> , 2005)
Neotroviridin_C	<i>Trichoderma atroviride</i>	Ac	U	G	A	L	U	Q	J	L	U	G	J	U	P	L	U	U	Q	Lxol	1744,6	895,3	(Oh <i>et al.</i> , 2005)
Neotroviridin_D	<i>Trichoderma atroviride</i>	Ac	U	G	A	L	J	Q	J	L	U	G	J	U	P	L	U	U	Q	Lxol	1758,7	902,4	(Oh <i>et al.</i> , 2005)
Saturnisporin_SA_IV	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	Ac	U	A	U	A	U	Q	U	L	U	G	U	U	P	V	J	Q	Q	Fol	1779,5	912,8	(Rebuffat <i>et al.</i> , 1993)
Trichokindin_Ia	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	S	A	U	U	Q	J	L	U	A	U	U	P	L	U	U	Q	Iol	1746,5	896,3	(Iida <i>et al.</i> , 1994)
Trichokindin_Ib	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	S	A	U	J	Q	U	L	U	A	U	U	P	L	U	U	Q	Iol	1746,5	896,3	(Iida <i>et al.</i> , 1994)
Trichokindin_IIa	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	S	A	U	U	Q	U	L	U	A	J	U	P	L	U	U	Q	Iol	1746,5	896,3	(Iida <i>et al.</i> , 1994)
Trichokindin_IIb	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	S	A	U	J	Q	J	L	U	A	U	U	P	L	U	U	Q	Lol	1760,6	903,3	(Iida <i>et al.</i> , 1994)
Trichokindin_IIIa	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	S	A	U	U	Q	J	L	U	A	J	U	P	L	U	U	Q	Lol	1760,6	903,3	(Iida <i>et al.</i> , 1994)
Trichokindin_IIIb	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	S	A	U	J	Q	U	L	U	A	J	U	P	L	U	U	Q	Lol	1760,6	903,3	(Iida <i>et al.</i> , 1994)
Trichokindin_IV	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	S	A	U	J	Q	J	L	U	A	U	U	P	L	U	U	Q	Iol	1760,6	903,3	(Iida <i>et al.</i> , 1994)
Trichokindin_Va	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	S	A	U	U	Q	J	L	U	A	J	U	P	L	U	U	Q	Iol	1760,6	903,3	(Iida <i>et al.</i> , 1994)
Trichokindin_Vb	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	S	A	U	J	Q	U	L	U	A	J	U	P	L	U	U	Q	Iol	1760,6	903,3	(Iida <i>et al.</i> , 1994)
Trichokindin_VI	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	S	A	U	J	Q	J	L	U	A	J	U	P	L	U	U	Q	Lol	1774,6	910,3	(Iida <i>et al.</i> , 1994)
Trichokindin_VII	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	S	A	U	J	Q	J	L	U	A	J	U	P	L	U	U	Q	Iol	1774,6	910,3	(Iida <i>et al.</i> , 1994)
Trichorzin TVB_I	<i>Trichoderma virens</i>	Ac	U	G	A	V	U	Q	U	A	U	S	L	U	P	L	U	U	Q	Vol	1704,5	875,3	(Wiest <i>et al.</i> , 2002)
Trichorzin TVB_II	<i>Trichoderma virens</i>	Ac	U	G	A	L	U	Q	U	A	U	S	L	U	P	L	U	U	Q	Vol	1718,5	882,3	(Wiest <i>et al.</i> , 2002)
Trichorzin TVB_IV	<i>Trichoderma virens</i>	Ac	U	G	A	L	U	Q	J	A	U	S	L	U	P	L	U	U	Q	Vol	1732,6	889,3	(Wiest <i>et al.</i> , 2002)
Trichorzin_HA_I	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	G	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	L	U	U	Q	Lol	1702,5	874,2	(Goulard <i>et al.</i> , 1995)
Trichorzin_HA_II	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	G	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	L	U	J	Q	Lol	1716,6	881,3	(Goulard <i>et al.</i> , 1995)
Trichorzin_HA_III	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	G	A	U	J	Q	U	V	U	G	L	U	P	L	U	U	Q	Lol	1716,6	881,3	(Goulard <i>et al.</i> , 1995)
Trichorzin_HA_V	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	G	A	U	J	Q	U	V	U	G	L	U	P	L	U	J	Q	Lol	1730,6	888,3	(Goulard <i>et al.</i> , 1995)

Trichorzin_HA_VI	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U G A U J Q J V U G L U P L U J Q Lol	1744,7	895,3	(Goulard <i>et al.</i> , 1995)
Trichorzin_HA_VII	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U G A U J Q V V U G L U P L U J Q Lol	1744,7	895,3	(Goulard <i>et al.</i> , 1995)
Trichorzin_MA_I	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U S A U U Q U L U G L U P L U U Q Vol	1732,5	889,3	(Goulard <i>et al.</i> , 1995)
Trichorzin_MA_II	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U S A U J Q U L U G L U P L U U Q Vol	1746,6	896,3	(Goulard <i>et al.</i> , 1995)
Trichorzin_MA_III	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U S A U J Q J L U G L U P L U U Q Vol	1760,6	903,3	(Goulard <i>et al.</i> , 1995)
Trichorzin_PA_II	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U S A U J Q U V U G L U P L U U Q Wol	1819,6	932,8	(Leclerc <i>et al.</i> , 1998a)
Trichorzin_PA_IV	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U S A U J Q J V U G L U P L U U Q Wol	1833,6	939,8	(Leclerc <i>et al.</i> , 1998a)
Trichorzin_PA_IX	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U S A J J Q U V U G L U P L U U Q Fol	1794,6	920,3	(Leclerc <i>et al.</i> , 1998a)
Trichorzin_PA_V	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U S A J J Q U V U G L U P L U U Q Wol	1833,6	939,8	(Leclerc <i>et al.</i> , 1998a)
Trichorzin_PA_VI	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U S A U J Q U V U G L U P L U U Q Fol	1780,6	913,3	(Leclerc <i>et al.</i> , 1998a)
Trichorzin_PA_VII	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U S A J J Q U V U G L U P L U U Q Wol	1833,6	939,8	(Leclerc <i>et al.</i> , 1998a)
Trichorzin_PA_VIII	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U S A U J Q J V U G L U P L U U Q Fol	1794,6	920,3	(Leclerc <i>et al.</i> , 1998a)
Trichorzin_PAU4	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U S A U U Q U V U G L U P L U U Q Wol	1805,5	925,7	(Leclerc <i>et al.</i> , 1998a)
Trichostromaticin A	<i>Trichoderma stromaticum</i>	Ac	U A U A U U Q U Vx U Q U P Lx U U Q Lxol	1759,5	902,7	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006a)
Trichostromaticin B	<i>Trichoderma stromaticum</i>	Ac	U A U A U U Q U Vx U Q U P Lx U U Q Lxol	1759,5	902,7	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006a)
Trichostromaticin C	<i>Trichoderma stromaticum</i>	Ac	U A U A U U Q U Vx U Q U P Lx U U Q Lxol	1759,5	902,7	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006a)
Trichostromaticin D	<i>Trichoderma stromaticum</i>	Ac	U A U A U U Q U Vx U Q U P Lx U Vx Q Lxol	1773,5	909,8	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006a)
Trichostromaticin E	<i>Trichoderma stromaticum</i>	Ac	U A U A U U Q U Lx U Q U P Lx U Vx Q Lxol	1787,5	916,8	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006a)
Trichotoxin_A-40	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G U L U E U U U A U U P L U J Q Vol	1717,4	881,7	(Brückner <i>et al.</i> , 1979)
Trichotoxin_A-40_I	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G U L U Q U U A A U U P L U U E Vol	1689,4	867,7	(Jaworski et Brückner, 1999)
Trichotoxin_A-40_II	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G U L U Q U U U A A U P L U U E Vol	1689,4	867,7	(Jaworski et Brückner, 1999)
Trichotoxin_A-40_III	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G U L U Q U U A A U U P L U J E Vol	1703,5	874,7	(Brückner et Przybylski, 1984b)
Trichotoxin_A-40_IV	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G U L U Q U U U A U U P L U U E Vol	1703,4	874,7	(Brückner et Przybylski, 1984b)
Trichotoxin_A-40_V	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G U L U Q U U U A U U P L U J E Vol	1717,4	881,7	(Jaworski et Brückner, 1999)
Trichotoxin_A-40_Va	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U A U L U Q U U U A U U P L U U E Vol	1717,4	881,7	(Brückner et Przybylski, 1984b)
Trichotoxin_A-50_E	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G U L U Q U U U A A U P L U U Q Vol	1688,4	867,2	(Brückner et Przybylski, 1984b)
Trichotoxin_A-50_F	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G U L U Q U U A A A U P L U J Q Vol	1688,5	867,3	(Brückner et Przybylski, 1984b)
Trichotoxin_A-50_G	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G U L U Q U U U A A U P L U J Q Vol	1702,5	874,3	(Brückner et Przybylski, 1984b)
Trichotoxin_A-50_H	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U A U L U Q U U U A A U P L U J Q Vol	1716,5	881,3	(Brückner et Przybylski, 1984b)
Trichotoxin_A-50_I	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G U L U Q U U U A U U P L U J Q Vol	1716,5	881,2	(Brückner et Przybylski, 1984b)
Trichotoxin_A-50_J	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U A U L U Q U U U A U U P L U J Q Vol	1730,5	888,2	(Brückner et Przybylski, 1984b)
Trichotoxin_VI	<i>Trichoderma</i>	Ac	U A U L U E U U U A U U P L U U Q Vol	1717,4	881,7	(Sabareesh et Balaram, 2006)
Trichovirin-Ia	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G A L A Q Vx V U G U U P L U U Q Lol	1702,6	874,3	(Jaworski <i>et al.</i> , 1999)
Trichovirin-Ib	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G A L U Q A V U G J U P L U U Q Lol	1702,6	874,3	(Jaworski <i>et al.</i> , 1999)
Trichovirin-IIa	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G A L A Q U V U G J U P L U U Q Lol	1702,6	874,3	(Jaworski <i>et al.</i> , 1999)
Trichovirin-IIb	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G A L U Q U V U G U U P L U U Q Lol	1702,5	874,2	(Jaworski <i>et al.</i> , 1999)
Trichovirin-IIc	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U G A L U Q Vx V U G U U P L U U Q Lol	1716,6	881,3	(Jaworski <i>et al.</i> , 1999)

Stilboflavin_B_5	<i>Silbella flavipes</i>	Ac U P U A U U Q U L U G U U P V U U Q Q Vol	1913,5	979,7	(Jaworski et Brückner, 2001)
Stilboflavin_B_6	<i>Silbella flavipes</i>	Ac U P U A U U Q U V U G U U P V U U Q Q Vol	1899,5	972,7	(Jaworski et Brückner, 2001)
Stilboflavin_B_7	<i>Silbella flavipes</i>	Ac U P U A U U Q U L U G U U P V U U Q Q Lol	1927,5	986,7	(Jaworski et Brückner, 2001)
Stilboflavin_B_8	<i>Silbella flavipes</i>	Ac U P U A U U Q U V U G U U P V U U Q Q Lol	1913,5	979,7	(Jaworski et Brückner, 2001)
Stilboflavin_B_9	<i>Silbella flavipes</i>	Ac U P U A U U Q U L U G U U P V U U Q Q lol	1927,5	986,7	(Jaworski et Brückner, 2001)
Suzukacillin-A 1	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U Vx U G U U P Vx U U Q Q Fol	1907,5	976,7	(Krause et al., 2006b)
Suzukacillin-A 10a	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U Vx U G Lx U P Vx U Vx Q Q Fol	1949,7	997,8	(Krause et al., 2006b)
Suzukacillin-A 10b	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U Lx U G Lx U P Vx U Vx Q Q Fol	1963,7	1004,8	(Krause et al., 2006b)
Suzukacillin-A 11a	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U Lx U G Lx U P Vx U U Q Q Fol	1949,6	997,8	(Krause et al., 2006b)
Suzukacillin-A 11b	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U Lx U G Lx U P Vx U Vx Q Q Fol	1963,7	1004,8	(Krause et al., 2006b)
Suzukacillin-A 12	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U U Q U Lx U G Lx U P Vx U Vx Q Q Fol	1977,6	1011,8	(Krause et al., 2006b)
Suzukacillin-A 13	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U Lx U G Lx U P Vx U Vx Q Q Fol	1963,7	1004,8	(Krause et al., 2006b)
Suzukacillin-A 2	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U Lx U G U U P Vx U U Q Q Fol	1921,5	983,8	(Krause et al., 2006b)
Suzukacillin-A 3	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U Vx U G U U P Vx U Vx Q Q Fol	1921,6	983,8	(Krause et al., 2006b)
Suzukacillin-A 4	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U Lx U G U U P Vx U Vx Q Q Fol	1935,6	990,8	(Krause et al., 2006b)
Suzukacillin-A 5	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U U Q U Lx U G U U P Vx U U Q Q Fol	1935,5	990,7	(Krause et al., 2006b)
Suzukacillin-A 6	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U Lx U G U U P Vx U U Q Q Fol	1921,5	983,8	(Krause et al., 2006b)
Suzukacillin-A 7	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U U Q U Lx U G U U P Vx U Vx Q Q Fol	1949,5	997,8	(Krause et al., 2006b)
Suzukacillin-A 8	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U Lx U G U U P Vx U Vx Q Q Fol	1935,6	990,8	(Krause et al., 2006b)
Suzukacillin-A 9	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U Lx U G Lx U P Vx U U Q Q Fol	1949,6	997,8	(Krause et al., 2006b)
Trichocellin_TC-A-I	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U L U G U U P V U U Q Q Fol	1921,5	983,8	(Wada et al., 1994)
Trichocellin_TC-A-II	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U L U G U U P V U J Q Q Fol	1935,6	990,8	(Wada et al., 1994)
Trichocellin_TC-A-III	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U I U G U U P V U U Q Q Fol	1921,5	983,8	(Wada et al., 1994)
Trichocellin_TC-A-IV	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U I U G U U P V U J Q Q Fol	1935,6	990,8	(Wada et al., 1994)
Trichocellin_TC-A-V	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U L U G L U P V U U Q Q Fol	1949,6	997,8	(Wada et al., 1994)
Trichocellin_TC-A-VI	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U L U G L U P V U J Q Q Fol	1963,7	1004,8	(Wada et al., 1994)
Trichocellin_TC-A-VII	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U I U G L U P V U U Q Q Fol	1949,6	997,8	(Wada et al., 1994)
Trichocellin_TC-A-VIII	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U I U G L U P V U J Q Q Fol	1963,7	1004,8	(Wada et al., 1994)
Trichocellin_TC-B-I	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U L U G U U P V U U E Q Fol	1922,5	984,2	(Wada et al., 1994)
Trichocellin_TC-B-II	<i>Trichoderma viride</i>	Ac U A U A U A Q U L U G U U P V U J E Q Fol	1936,6	991,3	(Wada et al., 1994)
Trichokonin_la	<i>Trichoderma koningii</i>	Ac U A U A U A Q U V U G L A P V U U Q Q Fol	1921,6	983,8	(Huang et al., 1995)
Trichokonin_lb	<i>Trichoderma koningii</i>	Ac U G U A U A Q U V U G L A P V U U Q Q Fol	1907,6	976,8	(Huang et al., 1995)
Trichokonin_lla	<i>Trichoderma koningii</i>	Ac U A U A U A Q U V U G L U P A U U Q Q Fol	1907,6	976,8	(Huang et al., 1996)
Trichokonin_llb	<i>Trichoderma koningii</i>	Ac A A U A U A Q U V U G L U P V U U Q Q Fol	1921,6	983,8	(Huang et al., 1996)
Trichokonin_llc	<i>Trichoderma koningii</i>	Ac U A A A U A Q U V U G L U P V U U Q Q Fol	1921,6	983,8	(Huang et al., 1996)
Trichokonin_IX	<i>Trichoderma koningii</i>	Ac U A U A U A Q U V U G L U P V U J Q Q Fol	1949,7	997,8	(Huang et al., 1995)
Trichokonin_VI	<i>Trichoderma koningii</i>	Ac U A U A U A Q U V U G L U P V U U Q Q Fol	1935,6	990,8	(Huang et al., 1996)

Trichokonin_VII	<i>Trichoderma koningii</i>	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	J	Q	Q	Fol	1949,7	997,8	(Huang <i>et al.</i> , 1996)
Trichokonin_VIII	<i>Trichoderma koningii</i>	Ac	U	A	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1949,5	997,8	(Huang <i>et al.</i> , 1996)
Trichosporin_TS-B-1a-1	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	G	U	A	U	Q	U	Lx	A	A	Vx	A	P	V	U	Vx	Q	Q	Fol	1921,7	983,9	(Iida <i>et al.</i> , 1993)
Trichosporin_TS-B-1a-2	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	G	A	U	U	Q	U	Lx	A	A	Vx	A	P	V	U	Vx	Q	Q	Fol	1921,7	983,9	(Sharman <i>et al.</i> , 1996)
Trichosporin_TS-B-1b	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	G	A	U	U	Q	U	Lx	U	G	Lx	A	P	V	U	A	Q	Q	Fol	1907,7	976,8	(Iida <i>et al.</i> , 1993)
Trichosporin_TS-B-1d	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	S	A	U	U	Q	U	Lx	U	G	Lx	A	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1951,6	998,8	(Sharman <i>et al.</i> , 1996)
Trichosporin_TS-B-1e	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	G	A	U	U	Q	U	Lx	U	G	Lx	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1935,6	990,8	(Iida <i>et al.</i> , 1993)
Trichosporin_TS-B-1f	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	S	A	U	U	Q	U	Lx	U	G	Lx	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1965,6	1005,8	(Sharman <i>et al.</i> , 1996)
Trichosporin_TS-B-1g	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	G	A	U	U	Q	U	Lx	U	G	Lx	A	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1921,6	983,8	(Iida <i>et al.</i> , 1993)
Trichosporin_TS-B-1h	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	G	A	U	U	Q	U	Lx	U	G	Lx	U	P	V	U	Vx	Q	Q	Fol	1949,7	997,8	(Sharman <i>et al.</i> , 1996)
Trichosporin_TS-B-1a	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	S	A	U	U	Q	U	L	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1965,6	1005,8	(Iida <i>et al.</i> , 1990)
Trichosporin_TS-B-IIIa	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	A	A	U	U	Q	U	L	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1949,6	997,8	(Iida <i>et al.</i> , 1990)
Trichosporin_TS-B-IIIb	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	A	A	U	U	Q	U	I	U	G	L	U	P	V	U	A	Q	Q	Fol	1935,6	990,8	(Iida <i>et al.</i> , 1990)
Trichosporin_TS-B-IIIc	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	A	A	A	U	Q	U	I	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1935,6	990,8	(Iida <i>et al.</i> , 1990)
Trichosporin_TS-B-IIId	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	A	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1935,6	990,8	(Iida <i>et al.</i> , 1990)
Trichosporin_TS-B-IVb	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	A	A	U	U	Q	U	L	U	G	L	U	P	V	U	J	Q	Q	Fol	1963,7	1004,8	(Iida <i>et al.</i> , 1990)
Trichosporin_TS-B-IVc	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1949,5	997,8	(Iida <i>et al.</i> , 1990)
Trichosporin_TS-B-IVd	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	A	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	J	Q	Q	Fol	1949,7	997,8	(Iida <i>et al.</i> , 1990)
Trichosporin_TS-B-V	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	A	A	U	U	Q	U	I	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1949,6	997,8	(Iida <i>et al.</i> , 1990)
Trichosporin_TS-B-VIa	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	U	A	U	U	Q	U	I	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1963,6	1004,8	(Iida <i>et al.</i> , 1990)
Trichosporin_TS-B-VIb	<i>Trichoderma polysporum</i>	Ac	U	A	A	A	U	U	Q	U	I	U	G	L	U	P	V	U	J	Q	Q	Fol	1963,7	1004,8	(Iida <i>et al.</i> , 1990)

Annexe 2 : Peptaïbols à courte séquence : Origine, séquence, masse moléculaire calculée (M) et valeur théorique du rapport m/z du monochargé sodium.
 Ac = acétyl, Aol = Alaninol, Fol = Phénylalaninol, Iol = Isoleucinol, Jol = Isovalinol, Lol = Leucinol, Lx = Leucine/Isoleucine, Lxol = Leucinol/Isoleucinol, Sol = Sérinol, Uol = Acide α -aminoisobutanol, Vol = Valinol, Vx = Valine/Isovaline, Vxol = Valinol/Isovalinol
 (en date du 1^{er} mai 2007)

Nom	Isolé de	Position																M (Da)	[M+Na] ⁺ m/z	Source bibliographique	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16				17
Peptaïbolin	<i>Sepedonium sp.</i>	Ac	L	U	L	U	Fol												589,2	612,2	(Hüllsman <i>et al.</i> , 1998)
Harzianin_HB_I	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	N	L	I	U	P	J	L	U	P	Lol						1160,5	1183,5	(Augeven-Bour <i>et al.</i> , 1997)
Harzianin_HK_VI	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Ac	U	N	I	I	U	P	L	L	U	P	Lol						1174,5	1197,5	(Rebuffat <i>et al.</i> , 1996)
Hypomurocin_A_I	<i>Hypocrea muroiana</i>	Ac	U	Q	V	V	U	P	L	L	U	P	Lol						1160,5	1183,5	(Becker <i>et al.</i> , 1997)
Hypomurocin_A_II	<i>Hypocrea muroiana</i>	Ac	J	Q	V	V	U	P	L	L	U	P	Lol						1174,5	1197,5	(Becker <i>et al.</i> , 1997)
Hypomurocin_A_III	<i>Hypocrea muroiana</i>	Ac	U	Q	V	L	U	P	L	I	U	P	Lol						1174,5	1197,5	(Becker <i>et al.</i> , 1997)
Hypomurocin_A_IV	<i>Hypocrea muroiana</i>	Ac	U	Q	I	V	U	P	L	L	U	P	Lol						1174,5	1197,5	(Becker <i>et al.</i> , 1997)
Hypomurocin_A_V	<i>Hypocrea muroiana</i>	Ac	U	Q	I	I	U	P	L	L	U	P	Lol						1188,5	1211,5	(Becker <i>et al.</i> , 1997)
Hypomurocin_A_Va	<i>Hypocrea muroiana</i>	Ac	U	Q	I	L	U	P	L	I	U	P	Lol						1188,5	1211,5	(Becker <i>et al.</i> , 1997)
Trichobrachine A-I	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	L	L	U	P	L	U	U	P	Lol						1146,4	1169,4	(Mohamed-Benkada <i>et al.</i> , 2006)
Trichobrachine A-II	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	L	L	U	P	V	L	U	P	Vol						1146,5	1169,5	(Mohamed-Benkada <i>et al.</i> , 2006)
Trichobrachine A-III	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	V	L	U	P	L	L	U	P	Vol						1146,5	1169,5	(Mohamed-Benkada <i>et al.</i> , 2006)
Trichobrachine A-IV	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	L	V	U	P	L	L	U	P	Vol						1146,5	1169,5	(Mohamed-Benkada <i>et al.</i> , 2006)
Trichobrachine A-IV a	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Lx	Lx	U	P	Lx	V	U	P	Vol						1146,5	1169,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-IV b	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	V	V	U	P	Lx	Lx	U	P	Lol						1146,5	1169,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-IV c	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	V	Lx	U	P	V	Lx	U	P	Lol						1146,5	1169,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-IV d	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Lx	V	U	P	V	Lx	U	P	Lol						1146,5	1169,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-IX	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lol						1174,5	1197,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VI a	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Vx	Vx	U	P	Lx	Vx	U	P	Vxol						1118,4	1141,4	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VI b	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Lx	Vx	U	P	Vx	Vx	U	P	Vxol						1118,4	1141,4	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VI c	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Vx	Lx	U	P	Vx	Vx	U	P	Vxol						1118,4	1141,4	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VI d	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Vx	Vx	U	P	Vx	Lx	U	P	Vxol						1118,4	1141,4	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VI e	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Vx	Vx	U	P	Vx	Vx	U	P	Lxol						1118,4	1141,4	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VII a	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	V	Lx	U	P	V	Lx	U	P	Vol						1132,5	1155,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VII b	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	V	Lx	U	P	Lx	Vx	U	P	Vol						1132,5	1155,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VII c	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	V	V	U	P	Lx	Lx	U	P	Vol						1132,5	1155,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VII d	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Lx	Lx	U	P	V	V	U	P	Vol						1132,5	1155,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VII e	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Lx	V	U	P	V	Lx	U	P	Vol						1132,5	1155,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VII f	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Lx	V	U	P	Lx	V	U	P	Vol						1132,5	1155,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VII g	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Lx	V	U	P	V	V	U	P	Lol						1132,4	1155,4	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)

Trichobrachine A-VII h	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	V	Lx	U	P	V	V	U	P	Lol	1132,4	1155,4	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VII i	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	V	V	U	P	Lx	V	U	P	Lol	1132,4	1155,4	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VII j	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	V	V	U	P	V	Lx	U	P	Lol	1132,4	1155,4	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VIII	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vol	1160,5	1183,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VIII	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Lx	V	U	P	Lx	Lx	U	P	Lol	1160,5	1183,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VIII	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	V	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lol	1160,5	1183,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VIII	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Lx	Lx	U	P	Lx	V	U	P	Lol	1160,5	1183,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine A-VIII	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	Lx	Lx	U	P	V	Lx	U	P	Lol	1160,5	1183,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine B-I	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	L	L	U	P	V	U	V	P	Lol	1146,5	1169,5	(Mohamed-Benkada <i>et al.</i> , 2006)
Trichobrachine B-II	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	V	L	U	P	L	U	V	P	Lol	1146,5	1169,5	(Mohamed-Benkada <i>et al.</i> , 2006)
Trichobrachine B-III	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	L	V	U	P	L	U	V	P	Lol	1146,5	1169,5	(Mohamed-Benkada <i>et al.</i> , 2006)
Trichobrachine B-IV	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	N	L	L	U	P	L	U	V	P	Vol	1146,5	1169,5	(Mohamed-Benkada <i>et al.</i> , 2006)
Trichobrachine C-I	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	Q	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lol	1188,5	1211,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrachine C-II	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ac	U	Q	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lol	1188,5	1211,5	(Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
Trichobrevin A_Ia	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	A	Vx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Aol	1075,5	1098,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin A_Ib	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	A	U	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vxol	1075,4	1098,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin A_Ic	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	A	Vx	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Uol	1075,4	1098,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin A_Id	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	A	U	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vxol	1075,4	1098,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin A_Ila	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	A	Vx	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vxol	1089,4	1112,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin A_Ilb	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	A	U	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1089,4	1112,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin A_Illa	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	A	Vx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vxol	1103,5	1126,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin A_IIIb	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	A	Vx	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1103,4	1126,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin A_IIIc	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	A	Vx	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1103,4	1126,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin A_IVa	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	A	Vx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1117,5	1140,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin A_IVb	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	A	Vx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1117,5	1140,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin B_Ia	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	S	Vx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Uol	1105,5	1128,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin B_Ib	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	S	Vx	U	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1105,4	1128,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin B_Ic	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	S	Vx	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vxol	1105,4	1128,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin B_Ila	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	S	Vx	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1119,4	1142,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin B_Ilb	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	S	Vx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vxol	1119,5	1142,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin B_Illa	<i>Trichoderma brevicompactum</i> complex	Ac	U	S	Vx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1133,5	1156,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)

Trichobrevin B_IIIb	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	U	S	Vx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1133,5	1156,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichobrevin B_IIIc	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	U	S	Vx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1133,5	1156,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichocryptin A_Ia	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Vx	U	P	Vx	U	P	U	Lx	U	P	Lxol	1101,4	1124,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichocryptin A_Ib	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Vx	U	P	Vx	U	P	U	Lx	U	P	Lxol	1101,4	1124,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichocryptin A_Ic	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	U	P	U	Vx	U	P	Lxol	1101,4	1124,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichocryptin A_IIa	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	U	P	U	Lx	U	P	Lxol	1115,4	1138,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichocryptin A_IIb	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	U	P	U	Lx	U	P	Lxol	1115,4	1138,4	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichocryptin A_IIIa	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vxol	1129,5	1152,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichocryptin A_IIIb	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	U	P	Lx	Vx	U	P	Lxol	1129,5	1152,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichocryptin A_IVa	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	Vx	P	Lx	Vx	U	P	Vxol	1129,5	1152,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichocryptin A_IVb	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1143,5	1166,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichocryptin A_IVc	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1143,5	1166,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichocryptin A_Va	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1157,5	1180,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichocryptin A_Vb	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1157,5	1180,5	(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
Trichofumin A	<i>Trichoderma sp.</i>	Ac	V	Q	L	V	U	P	L	L	U	P	Lol	1188,6	1211,6	(Berg <i>et al.</i> , 2003)
Trichofumin B	<i>Trichoderma sp.</i>	Ac	V	Q	L	L	U	P	L	L	U	P	Lol	1202,6	1225,6	(Berg <i>et al.</i> , 2003)
Trichorovin_TV_Ia	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	N	V	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vol	1146,5	1169,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_Ib	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	N	V	V	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1146,5	1169,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_IIa	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	N	V	V	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1146,5	1169,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_IIb	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	N	Lx	V	U	P	Lx	Lx	U	P	Vol	1146,5	1169,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_IIIa	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	Q	V	V	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1160,5	1183,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_IIIb	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	Q	V	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vol	1160,5	1183,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_IVa	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	Q	V	V	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1160,5	1183,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_IVb	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	Q	Lx	V	U	P	Lx	Lx	U	P	Vol	1160,5	1183,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_IVc	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	N	V	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1160,5	1183,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_IXa	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	Q	V	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1174,5	1197,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_IXb	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	Q	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vol	1174,5	1197,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_Va	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	N	V	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1160,5	1183,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_Vb	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	N	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vol	1160,5	1183,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_VIa	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	N	V	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1160,5	1183,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_VIb	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	N	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vol	1160,5	1183,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_VIIa	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	N	Lx	V	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1160,5	1183,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)
Trichorovin_TV_VIIb	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	Q	V	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vol	1160,5	1183,5	(Wada <i>et al.</i> , 1995)

Trichorovin_TV_VIII	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	Q	V	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1174,5	1197,5	(Wada et al., 1995)			
Trichorovin_TV_Xa	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	Q	Lx	V	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1174,5	1197,5	(Wada et al., 1995)			
Trichorovin_TV_Xb	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	N	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1174,5	1197,5	(Wada et al., 1995)			
Trichorovin_TV_XI	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	N	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1174,5	1197,5	(Wada et al., 1995)			
Trichorovin_TV_XIIa	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	N	I	I	U	P	L	L	U	P	lol	1174,5	1197,5	(Wada et al., 1995)			
Trichorovin_TV_XIIb	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	N	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lol	1174,5	1197,5	(Wada et al., 1995)			
Trichorovin_TV_XIII	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	Q	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lol	1188,5	1211,5	(Wada et al., 1995)			
Trichorovin_TV_XIV	<i>Trichoderma viride</i>	Ac	U	Q	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1188,5	1211,5	(Wada et al., 1995)			
Trichorozin_I	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	N	I	L	U	P	I	L	U	P	Vol	1160,5	1183,5	(lida et al., 1995)			
Trichorozin_II	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	Q	I	L	U	P	I	L	U	P	Vol	1174,5	1197,5	(lida et al., 1995)			
Trichorozin_III	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	N	I	L	U	P	I	L	U	P	Lol	1174,5	1197,5	(lida et al., 1995)			
Trichorozin_IV	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	Q	I	L	U	P	I	L	U	P	Lol	1188,5	1211,5	(lida et al., 1995)			
Cervinin_1	<i>Mycogone cervina</i>	Ac	L	U	P	U	L	U	P	A	U	P	V	Lol	1186,4	1209,4	(Wilhelm et al., 2004)		
Trichocryptin B_Ia	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Vx	U	P	Vx	Vx	U	P	U	Vx	U	P	Lxol	1186,4	1209,4	(Degenkolb et al., 2006b)		
Trichocryptin B_Ib	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	Vx	U	P	U	U	U	P	Lxol	1186,4	1209,4	(Degenkolb et al., 2006b)		
Trichocryptin B_Ila	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Vx	U	P	Vx	Vx	U	P	U	Lx	U	P	Lxol	1200,4	1223,4	(Degenkolb et al., 2006b)		
Trichocryptin B_Ilb	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	Vx	U	P	U	Vx	U	P	Lxol	1200,4	1223,4	(Degenkolb et al., 2006b)		
Trichocryptin B_Illa	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	Vx	U	P	U	Lx	U	P	Lxol	1214,5	1237,5	(Degenkolb et al., 2006b)		
Trichocryptin B_Illb	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	Vx	U	P	U	Lx	U	P	Lxol	1214,5	1237,5	(Degenkolb et al., 2006b)		
Trichocryptin B_IVa	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	Lx	U	P	U	Lx	U	P	Lxol	1228,5	1251,5	(Degenkolb et al., 2006b)		
Trichocryptin B_IVb	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	Lx	U	P	U	Lx	U	P	Lxol	1228,5	1251,5	(Degenkolb et al., 2006b)		
Trichocryptin B_Va	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vxol	1242,6	1265,6	(Degenkolb et al., 2006b)		
Trichocryptin B_Vb	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	Lx	U	P	Vx	Lx	U	P	Lxol	1242,5	1265,5	(Degenkolb et al., 2006b)		
Trichocryptin B_Vc	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1242,5	1265,5	(Degenkolb et al., 2006b)		
Trichocryptin B_Vd	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Vxol	1242,6	1265,6	(Degenkolb et al., 2006b)		
Trichocryptin B_VIa	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1256,6	1279,6	(Degenkolb et al., 2006b)		
Trichocryptin B_VIb	<i>Trichoderma brevicompactum complex</i>	Ac	Lx	U	P	Vx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1256,6	1279,6	(Degenkolb et al., 2006b)		
Trichofumin C	<i>Trichoderma sp.</i>	Ac	V	Q	V	U	Q	Q	L	L	P	L	U	P	Lol	1444,7	1467,7	(Berg et al., 2003)	
Trichofumin D	<i>Trichoderma sp.</i>	Ac	V	Q	L	U	Q	Q	L	L	P	L	U	P	Lol	1458,7	1481,7	(Berg et al., 2003)	
Bergofungin_D	<i>Emericellopsis donezkii</i>	Ac	V	U	U	V	G	L	U	U	O	Q	U	O	U	Fol	1425,4	1448,4	(Berg et al., 1999)
Harzianin_HC_I	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	N	L	U	P	S	V	U	P	U	L	U	P	Lol	1401,5	1424,5	(Rebuffat et al., 1995)
Harzianin_HC_III	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	N	L	U	P	S	V	U	P	J	L	U	P	Lol	1415,5	1438,5	(Rebuffat et al., 1995)
Harzianin_HC_IX	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac	U	N	L	U	P	A	I	U	P	J	L	U	P	Lol	1413,6	1436,6	(Rebuffat et al., 1995)

Harzianin_HC_VI	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac U N L U P A V U P U L U P Lol	1385,5	1408,5	(Rebuffat <i>et al.</i> , 1995)
Harzianin_HC_VIII	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac U N L U P A V U P J L U P Lol	1399,5	1422,5	(Rebuffat <i>et al.</i> , 1995)
Harzianin_HC_X	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac U Q L U P A V U P J L U P Lol	1413,6	1436,6	(Rebuffat <i>et al.</i> , 1995)
Harzianin_HC_XI	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac U N L U P S I U P U L U P Lol	1415,5	1438,5	(Rebuffat <i>et al.</i> , 1995)
Harzianin_HC_XII	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac U N L U P S I U P J L U P Lol	1429,6	1452,6	(Rebuffat <i>et al.</i> , 1995)
Harzianin_HC_XIII	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac U Q L U P S I U P J L U P Lol	1443,6	1466,6	(Rebuffat <i>et al.</i> , 1995)
Harzianin_HC_XIV	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac U N L U P A I U P U L U P Lol	1399,5	1422,5	(Rebuffat <i>et al.</i> , 1995)
Harzianin_HC_XV	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac U Q L U P A I U P J L U P Lol	1427,6	1450,6	(Rebuffat <i>et al.</i> , 1995) (Goulard <i>et al.</i> , 1995)
Harzianin_PCU4	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ac U N L U P S I U P U L U P Vol	1401,5	1424,5	(Leclerc <i>et al.</i> , 1998a)
Ampullosporin	<i>Sepedonium ampullosporum</i>	Ac W A U U L U Q U U U Q L U Q Lol	1621,5	1644,5	(Ritzau <i>et al.</i> , 1997)
Ampullosporin_B	<i>Sepedonium ampullosporum</i>	Ac W A U U L U Q A U U Q L U Q Lol	1607,5	1630,5	(Kronen <i>et al.</i> , 2001)
Ampullosporin_C	<i>Sepedonium ampullosporum</i>	Ac W A U U L U Q U A U Q L U Q Lol	1607,5	1630,5	(Kronen <i>et al.</i> , 2001)
Ampullosporin_D	<i>Sepedonium ampullosporum</i>	Ac W A U U L U Q U U A Q L U Q Lol	1607,5	1630,5	(Kronen <i>et al.</i> , 2001)
Ampullosporin_E1	<i>Sepedonium ampullosporum</i>	Ac W A U U L U Q A U U Q L A Q Lol	1593,5	1616,5	(Kronen <i>et al.</i> , 2001)
Ampullosporin_E2	<i>Sepedonium ampullosporum</i>	Ac W A U U L U Q U A A Q L U Q Lol	1593,5	1616,5	(Kronen <i>et al.</i> , 2001)
Ampullosporin_E3	<i>Sepedonium ampullosporum</i>	Ac W A U U L U Q U U A Q L A Q Lol	1593,5	1616,5	(Kronen <i>et al.</i> , 2001)
Ampullosporin_E4	<i>Sepedonium ampullosporum</i>	Ac W A U U L U Q A A U Q L U Q Lol	1593,5	1616,5	(Kronen <i>et al.</i> , 2001)
Bergofungin_A	<i>Emericellopsis donezkii</i>	Ac V U U U V G L U U O Q J O U Fol	1524,5	1547,5	(Berg <i>et al.</i> , 1996)
Bergofungin_B	<i>Emericellopsis donezkii</i>	Ac V U U U V G L V U O Q U O U Fol	1524,5	1547,5	(Berg <i>et al.</i> , 1996)
Bergofungin_C	<i>Emericellopsis donezkii</i>	Ac V U U U V G L U U O Q U O U Fol	1510,4	1533,4	(Berg <i>et al.</i> , 1996)
Emerimicin_III	<i>Emericellopsis microspora</i>	Ac F U U U V G L U U O Q J O U Fol	1572,5	1595,5	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981) (Brückner et Przybylski, 1984b)
Emerimicin_IV	<i>Emericellopsis microspora</i>	Ac F U U U V G L U U O Q J O A Fol	1558,5	1581,5	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981) (Brückner et Przybylski, 1984b)
Heptaibin	<i>Emericellopsis sp.</i>	Ac F U U U V G L U U O Q U O U Fol	1558,4	1581,4	(Ishiyama <i>et al.</i> , 2000)
Samarosporin_I	<i>Emericellopsis microspora</i>	Ac F U U U V G L U U O Q J O A Fol	1558,5	1581,5	(Brückner et Przybylski, 1984b)
Samarosporin_II	<i>Emericellopsis microspora</i>	Ac F U U U V G L U U O Q J O U Fol	1572,5	1595,5	(Brückner et Przybylski, 1984b)
Stilbellin_I	<i>Emericellopsis microspora</i>	Ac F U U U V G L U U O Q J O A Fol	1558,5	1581,5	(Brückner et Przybylski, 1984b)
Stilbellin_II	<i>Emericellopsis microspora</i>	Ac F U U U V G L U U O Q J O U Fol	1572,5	1595,5	(Brückner et Przybylski, 1984b)
Tylopeptin_A	<i>Tylophilus neofelleus</i>	Ac W V U J A Q A U S U A L U Q Lol	1552,6	1575,6	(Lee <i>et al.</i> , 1999b)
Tylopeptin_B	<i>Tylophilus neofelleus</i>	Ac W V U U A Q A U S U A L U Q Lol	1538,5	1561,5	(Lee <i>et al.</i> , 1999b)
Antiamoebin_I	<i>Emericellopsis poonensis</i> , <i>Emericellopsis synnematicola</i> et <i>Cephalosporium pimprina</i>	Ac F U U U J G L U U O Q J O U P Fol	1669,5	1692,5	(Pandey <i>et al.</i> , 1977b), (Rinehart <i>et al.</i> , 1981), (Brückner et Przybylski, 1984b)
Antiamoebin_II	<i>Emericellopsis poonensis</i> , <i>Emericellopsis synnematicola</i> et <i>Cephalosporium pimprina</i>	Ac F U U U J G L U U O Q J P U P Fol	1653,5	1676,5	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981), (Brückner et Przybylski, 1984b)
Antiamoebin_III	<i>Emericellopsis poonensis</i> , <i>Emericellopsis synnematicola</i> et <i>Cephalosporium pimprina</i>	Ac F U U U U G L U U O Q J O U P Fol	1655,4	1678,4	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)

Antiamoebin_IV	<i>Emericellopsis poonensis</i> , <i>Emericellopsis synnematicola</i> et <i>Cephalosporium pimprina</i>	Ac	F	U	U	U	J	G	L	U	U	O	Q	J	O	U	P	Fol	1669,5	1692,5	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)
Antiamoebin_IX	<i>Stilbella erythrocephal</i> , <i>Stilbella</i> <i>fimetaria</i> et <i>Gliocladium catenulatum</i>	Ac	F	U	A	U	J	G	L	U	U	O	Q	J	O	U	P	Fol	1655,6	1678,6	(Jaworski et Brückner, 2000)
Antiamoebin_V	<i>Emericellopsis poonensis</i> , <i>Emericellopsis synnematicola</i> et <i>Cephalosporium pimprina</i>	Ac	F	U	U	U	J	A	L	U	U	O	Q	J	O	U	P	Fol	1683,5	1706,5	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)
Antiamoebin_VI	<i>Stilbella erythrocephal</i> , <i>Stilbella</i> <i>fimetaria</i> et <i>Gliocladium catenulatum</i>	Ac	F	U	U	U	U	G	L	U	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1641,4	1664,4	(Jaworski et Brückner, 2000)
Antiamoebin_VII	<i>Stilbella erythrocephal</i> , <i>Stilbella</i> <i>fimetaria</i> et <i>Gliocladium catenulatum</i>	Ac	F	A	U	J	U	G	L	U	U	O	Q	J	O	U	P	Fol	1655,6	1678,6	(Jaworski et Brückner, 2000)
Antiamoebin_VIII	<i>Stilbella erythrocephal</i> , <i>Stilbella</i> <i>fimetaria</i> et <i>Gliocladium catenulatum</i>	Ac	F	U	U	U	J	G	L	U	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1655,4	1678,4	(Jaworski et Brückner, 2000)
Antiamoebin_X	<i>Stilbella erythrocephal</i> , <i>Stilbella</i> <i>fimetaria</i> et <i>Gliocladium catenulatum</i>	Ac	F	U	U	U	J	G	L	J	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1669,5	1692,5	(Jaworski et Brückner, 2000)
Antiamoebin_XI	<i>Stilbella erythrocephal</i> , <i>Stilbella</i> <i>fimetaria</i> et <i>Gliocladium catenulatum</i>	Ac	F	U	U	U	U	A	L	U	U	O	Q	J	O	U	P	Fol	1669,5	1692,5	(Jaworski et Brückner, 2000)
Antiamoebin_XII	<i>Stilbella erythrocephal</i> , <i>Stilbella</i> <i>fimetaria</i> et <i>Gliocladium catenulatum</i>	Ac	F	U	U	U	U	G	L	A	U	O	Q	J	O	U	P	Fol	1641,5	1664,5	(Jaworski et Brückner, 2000)
Antiamoebin_XIII	<i>Stilbella erythrocephal</i> , <i>Stilbella</i> <i>fimetaria</i> et <i>Gliocladium catenulatum</i>	Ac	V	U	U	U	U	G	L	U	U	O	Q	J	O	U	P	Fol	1607,4	1630,4	(Jaworski et Brückner, 2000)
Antiamoebin_XIV	<i>Stilbella erythrocephal</i> , <i>Stilbella</i> <i>fimetaria</i> et <i>Gliocladium catenulatum</i>	Ac	V	U	U	U	V	G	L	U	U	O	Q	J	O	U	P	Fol	1621,5	1644,5	(Jaworski et Brückner, 2000)
Antiamoebin_XV	<i>Stilbella erythrocephal</i> , <i>Stilbella</i> <i>fimetaria</i> et <i>Gliocladium catenulatum</i>	Ac	L	U	U	U	U	G	L	U	U	O	Q	J	O	U	P	Fol	1621,5	1644,5	(Jaworski et Brückner, 2000)
Antiamoebin_XVI	<i>Stilbella erythrocephal</i> , <i>Stilbella</i> <i>fimetaria</i> et <i>Gliocladium catenulatum</i>	Ac	L	U	U	U	J	G	L	U	U	O	Q	J	O	U	P	Fol	1635,5	1658,5	(Jaworski et Brückner, 2000)
Cephaibol_A	<i>Acremonium tubakii</i>	Ac	F	U	U	U	U	G	L	J	U	O	Q	J	O	U	P	Fol	1669,5	1692,5	(Schiell <i>et al.</i> , 2001)
Cephaibol_A2	<i>Acremonium tubakii</i>	Ac	F	U	U	U	U	A	L	J	U	O	Q	J	O	U	P	Fol	1683,5	1706,5	(Schiell <i>et al.</i> , 2001)
Cephaibol_B	<i>Acremonium tubakii</i>	Ac	F	U	U	U	J	G	L	J	U	O	Q	J	O	U	P	Fol	1683,6	1706,6	(Schiell <i>et al.</i> , 2001)
Cephaibol_C	<i>Acremonium tubakii</i>	Ac	F	U	U	U	U	G	L	J	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1655,4	1678,4	(Schiell <i>et al.</i> , 2001)
Cephaibol_D	<i>Acremonium tubakii</i>	Ac	F	U	U	U	U	G	L	U	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1641,4	1664,4	(Schiell <i>et al.</i> , 2001)
Cephaibol_E	<i>Acremonium tubakii</i>	Ac	F	U	U	U	U	G	L	U	U	O	Q	J	O	U	P	Fol	1655,4	1678,4	(Schiell <i>et al.</i> , 2001)
Emerimicin_II_A	<i>Emericellopsis microspora</i>	Ac	W	I	Q	U	I	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1823,6	1846,6	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)
Emerimicin_II_B	<i>Emericellopsis microspora</i>	Ac	W	I	Q	J	I	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1837,7	1860,7	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)
Leu1_Zervamicin	<i>Emericellopsis salmosynnemata</i>	Ac	L	I	Q	J	I	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1764,7	1787,7	(Marsh, 1996)
Zervamicin_ZIA	<i>Emericellopsis salmosynnemata</i>	Ac	W	I	E	J	V	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1824,7	1847,7	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)
Zervamicin_ZIB	<i>Emericellopsis salmosynnemata</i>	Ac	W	V	E	J	I	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1824,7	1847,7	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)
Zervamicin_ZIB'	<i>Emericellopsis salmosynnemata</i>	Ac	W	I	E	U	I	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1824,6	1847,6	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)
Zervamicin_ZIC	<i>Emericellopsis salmosynnemata</i>	Ac	W	I	E	J	I	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1838,7	1861,7	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)
Zervamicin_ZII-1	<i>Emericellopsis salmosynnemata</i>	Ac	W	I	Q	U	V	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1809,6	1832,6	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)
Zervamicin_ZII-2	<i>Emericellopsis salmosynnemata</i>	Ac	W	I	Q	U	I	T	U	V	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1809,6	1832,6	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)

Zervamicin_ZII-3	<i>Emericellopsis salmosynnemata</i>	Ac	W	V	Q	U	I	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1809,6	1832,6	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)	
Zervamicin_ZII-4	<i>Emericellopsis salmosynnemata</i>	Ac	W	I	Q	J	V	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1823,7	1846,7	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)	
Zervamicin_ZII-5	<i>Emericellopsis salmosynnemata</i>	Ac	W	I	Q	J	I	T	U	V	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1823,7	1846,7	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)	
Zervamicin_ZIIA	<i>Emericellopsis salmosynnemata</i>	Ac	W	I	Q	U	I	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1823,6	1846,6	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)	
Zervamicin_ZIIB	<i>Emericellopsis salmosynnemata</i>	Ac	W	I	Q	J	I	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	Fol	1837,7	1860,7	(Rinehart <i>et al.</i> , 1981)	
Cephaibol_P	<i>Acremonium tubakii</i>	Ac	F	J	Q	U	I	T	U	L	U	O	Q	U	O	U	P	F	Sol	1857,7	1880,7	(Schiell <i>et al.</i> , 2001)
Cephaibol_Q	<i>Acremonium tubakii</i>	Ac	F	J	Q	U	I	T	U	L	U	P	Q	U	O	U	P	F	Sol	1841,7	1864,7	(Schiell <i>et al.</i> , 2001)

LES PEPTAÏBOLS, MÉTABOLITES FONGIQUES TOXIQUES EN MILIEU MARIN

Détection, quantification et implication pour la qualité de l'environnement et la salubrité des coquillages

Depuis plusieurs années, des épisodes de toxicité et de mortalités, restés inexpliqués, sont observés dans les populations de bivalves de la côte Atlantique. Suite à la mise en évidence de micromycètes toxigènes au niveau des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire, l'hypothèse d'une contamination par des toxines fongiques a été envisagée pour expliquer ces phénomènes.

Au cours de notre étude, la présence de peptaïbols, métabolites toxiques principalement synthétisés par les micromycètes du genre *Trichoderma*, a été démontrée pour la première fois et de manière significative dans des sédiments et des moules prélevés dans une zone conchylicole du Fier d'Ars (Île de Ré, France). Ce résultat apporte une preuve du développement de ces moisissures dans les écosystèmes marins. La mise en évidence de peptaïbols dans les moules suggère, de plus, une bioaccumulation vraisemblable de ces métabolites par les bivalves filtreurs en milieu naturel.

Des méthodes de quantification des peptaïbols à longue séquence dans les différentes matrices environnementales (sédiments et moules) ont alors été développée à l'aide de la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse. Sensibles et spécifiques, ces méthodologies autorisent la détermination précise des quantités traces de peptaïbols dans la gamme du nanogramme par gramme de matrice. Elles permettront d'appréhender les risques sanitaires potentiels pour les mollusques bivalves et les consommateurs humains.

Dans un dernier temps, l'embryotoxicité de différents groupes de peptaïbols et de sédiments contaminés a été démontrée à l'aide de bioessais sur le développement embryo-larvaire de l'huître *Crassostrea gigas*. La présence de ces toxines fongiques dans l'environnement marin représente donc un risque toxique potentiel pour la dynamique des populations de bivalves.

Mots clés : peptaïbols, zones conchylicoles, développement fongique, quantification, spectrométrie de masse, bioessai embryo-larvaire

PEPTAIBOLS, TOXIC FUNGAL METABOLITES IN COASTAL AREAS

Detection, quantification and ecotoxicological relevance

During the early 1990s, several cases of unexplained toxicity were observed in cultivated shellfish populations along the French Atlantic coast. No known factors of toxicity have been found to be responsible for these episodes. The hypothesis of a fungal contamination with a production of toxic metabolites has been proposed. Isolation of fungi from shellfish and sediments collected in farming areas showed that numerous saprophytic strains were present in these zones.

In the present study, different peptaibols were observed in marine sediments and mussels collected from a shellfish farming area (Fier d'Ars, Ré Island, France). Peptaibols are toxic fungal metabolites, mainly produced by *Trichoderma* sp. Their presence in natural samples constitutes a proof of fungal development in the marine environment. Contamination of shellfish suggests the potential bioaccumulation of these metabolites by filtering bivalves.

To establish a causal relationship between peptaibol concentrations and effects, quantification methods of long sequence peptaibols in marine sediments and organisms were developed by using high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The developed methods constitute the first sensitive assays for quantification of peptaibol trace amounts in the nanogram per gram range in environmental matrices. It will permit to assess the potential risks for shellfish and human consumers.

Finally, bioassays with oysters (*Crassostrea gigas*) were performed and demonstrated the embryotoxicity of peptaibols and contaminated sediments. Thus the presence of such compounds in coastal areas could represent a potential risk for marine bivalve development.

Keywords : peptaibols, shellfish farming areas, fungal development, quantification, mass spectrometry, bivalve bioassay.