

Thèse de Doctorat

Anne-Isaline VAN BOHEMEN

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : VENAM

Discipline : Science de la Vie et de la Santé-Sciences Pharmaceutique (CNU 85-86-87)
Spécialité : Pharmacochimie de substances naturelles-Chimie analytique
Unité de recherche : EA 2160-MMS-UFR sciences biologiques et Pharmaceutiques

Soutenue le 1^{er} avril 2016
Thèse N° : 77981

Métabolites de *Trichoderma* marins : Identification, quantification et valorisation en biocontrôle des peptaïbols

JURY

Rapporteurs :	David GARON, Professeur, Université de Caen Normandie Philippe VERITE, Professeur, Université de Rouen
Examineurs :	Marylène CHOLLET-KRUGLER, Maître de conférences, Université de Rennes I Philippe SIMONEAU, Professeur, Université d'Angers
Invité(s) :	Aurore ZALOUK-VERGNOUX, Maître de conférences, Université de Nantes
Directeur de Thèse :	Yves, François POUCHUS, Professeur, Université de Nantes
Encadrants de Thèse :	Aurore ZALOUK-VERGNOUX, Maître de conférences, Université de Nantes Nicolas RUIZ, Maître de conférences, Université de Nantes

A ma super Maman, qui m'a toujours encouragée et soutenue

A mes amis,

Aux Chantales d'eau

Si cette thèse était un champignon...

Monsieur le professeur Yves François Pouchus en serait le chêne protecteur, roi de la forêt soucieux d'en assurer la pérennité par sa bienveillance et ses compétences,

Madame Aurore Zalouk-Vergnoux, monsieur Nicolas Ruiz et monsieur Samuel Bertrand seraient les feuilles de ce chêne nervurées d'idées et de bon sens, qui au cours des saisons assurent la fertilisation de la terre,

Madame Marie-Claude Boumard et monsieur Thibaut Robiou du pont seraient le soleil, apportant leur énergie à la croissance de ce travail de thèse,

Madame la professeur Irina Druzhinina, Messieurs les professeurs Thomas Guillemette, Philippe Vérité, Bernard Bodo, Nicolas Inguibert, mesdames Léa Atanasova, Soizic Prado et messieurs Arnaud Bondon, Bernard Banaigs et Khoubab Ben Haj Salah seraient la pluie de compétences irriguant ce travail,

Les nutriments de toutes sortes nécessaires au développement de ce travail de thèse seraient apportés par Yann Guitton et par les laboratoires IFREMER, LCBE, CRIOBE et LABERCA,

Chantal Simonato, serait un petit papillon en charge du secrétariat et voyageant entre les géraniums de la faculté de pharmacie et la forêt du bâtiment ISOMER,

Le personnel d'MMS, serait autant d'oligoéléments présents dans l'environnement du champignon et apportant chacun leur aide à son bon développement,

Enfin, les doctorants du bureau : Marie Geiger (pour ses magnifiques chansons), Elodie Blanchet (instigatrice de la minute cu-cu-culturelle), Ana Camila Dos Santos Dias (mention spéciale Caïpirinha et samba), Thuy Hoang (pour les succulents plats vietnamiens, sa bonne humeur et pour les cours d'orthophonie), Lucie Ory (et son fabuleux Mac ☺, pour son altruisme), Mickael Couderc (et son cabécou qui déchausse les dents, ses idées saugrenues et ses monologues enrichissants) et Matthieu Le Bellec (merci à son sens de la poésie, et ses repas du midi « complet ») m'ayant accompagnés durant toutes cette thèse, ils seraient des petits glands ☺ tombant non loin du chêne qui donneront à leur tours de nouveaux arbres. Je les remercie pour tous les bons moments passés en leur compagnie ainsi que pour leur soutien. Un grand merci également aux stagiaires (Ngoc Nam Phong, van Huong Chu) petites fourmis ouvrières de passage dans la forêt MMS.



Je remercie les membres du jury de bien vouloir continuer la balade en forêt...

Liste des travaux et publications

- **Publications dans des revues internationales à comité de lecture:**

Angélique Carroux, Anne-Isaline Van Bohemen, Catherine Roullier, Thibaut Robiou du Pont, Marieke Vansteelandt, Arnaud Bondon, Aurore Zalouk-Vergnoux, Yves François Pouchus, and Nicolas RuizVan Bohemen Anne-Isaline, Zalouk-Vergnoux Aurore, Poirier Laurence, Phuong Nam Ngoc, Inguimbert Nicolas, Ben Haj Salah Khoubaib, Ruiz Nicolas, Pouchus Yves François (2016). "**Development and validation of LC-MS methods for peptaibol quantification in fungal extracts according to their lengths.**" Journal of chromatography B **1009-1010**: 25-33.

Anne-Isaline Van Bohemen, Nicolas Ruiz, Aurore Zalouk-Vergnoux, Thibaut Robiou du Pont, Marie-Claude Boumard, Yann Renaux, Philippe Simoneau, Yves François Pouchus, Thomas Guillemette (2016). "**Antifungal activity of peptaibols from *Trichoderma* spp. on *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea***" Applied and Environmental Microbiology (submitted)

- **Communications orales dans des congrès internationaux:**

Biocontrol 2014, 24-26/09/2014, Perpignan: "Marine-derived *Trichoderma* strains producing peptaibols as a potential source of new biocontrol agents"

MAFNAP 2015, 22-24/07/2015, Nantes: "Marine-derived fungi, a new source for bio-control agents: antifungal activity of peptaibols and of a peptaibol-producing strain, *Trichoderma atroviride*"

- **Communication orale aux journées scientifiques de l'école doctorale:**

Journées scientifiques de l'école doctorale VENAM, 4-5/12/2014, Angers: "Marine-derived *Trichoderma* strains producing peptaibols as a potential source of new biocontrol agents"

- **Posters dans des congrès internationaux:**

MaNaPro 2012, 15-20/09/2013, La Toja, Espagne: "Unprecedented 17-residue peptaibiotics produced by marine-derived *Trichoderma atroviride*."

MAFNAP 2015, 22-24/07/2015, Nantes: "Development and validation of an LC-MS based method for quantification of peptaibols in marine-derived *Trichoderma* crude extracts"

Table des matières

Liste des travaux et publications	1
Table des matières	1
Liste des figures	1
Liste des tableaux	1
Liste des abréviations	1
Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : Etude bibliographique	1
1. Les <i>Trichoderma</i>	5
1.1. Caractéristiques.....	6
1.2. Interaction des <i>Trichoderma</i> avec l'Homme	11
1.3. Utilisation en biocontrôle.....	12
2. Les peptaïbols.....	23
2.1. Définition et classification	23
2.2. Biosynthèse des peptaïbols.....	25
2.3. Structures des peptaïbols.....	27
2.4. Propriétés membranaires des peptaibols	32
2.5. Activités biologiques des peptaïbols	37
2.6. Méthodologies d'obtention, de séquençage et d'analyse des peptaïbols	44
Chapitre 2 : Matériel et méthodes de l'ensemble de l'étude	51
1. Cultures fongiques des souches de <i>Trichoderma</i>	52
1.1. Souches de <i>Trichoderma</i>	52
1.2. Mise en culture des souches de <i>Trichoderma</i>	54

2. Isolement et purification des peptaïbols	55
3. Spectromètres de masse	57
3.1. Spectromètre de masse basse résolution	57
3.2. Spectromètre de masse haute résolution.....	65
Chapitre 3 : Identification de nouvelles séries de peptaïbols/peptaïbiotiques chez des souches marines de <i>Trichoderma</i>	69
1. Contexte	70
2. Matériel et Méthodes liés au chapitre.....	71
2.1. Cultures, extraction et purification des peptaïbols.....	71
2.2. Séquençage peptidique par spectrométrie de masse	71
2.3. Analyse de la composition en acides aminés.....	71
3. Peptaïbols à 15 résidus produits par des souches de <i>Trichoderma harzianum</i>	76
3.1. Contexte de l'étude	76
3.2. Production et isolement.....	78
3.3. Identification structurale des peptaïbols à 15 résidus.....	82
3.4. Bilan	97
4. Peptaïbiotiques à 17 résidus produits par des souches de <i>Trichoderma atroviride</i>	98
4.1. Contexte de l'étude	98
4.2. Production, purification et identification des peptaïbiotiques à 17 résidus- <i>Publication 1</i>	99
4.3. Elucidation structurale du résidu C-terminal	115
4.4. Bilan	134
5. Discussion	135
6. Conclusion du chapitre.....	140

Chapitre 4 : Valorisation des peptaïbols et des <i>Trichoderma</i> marins en biocontrôle	142
1. Contexte	143
2. Matériel et méthodes liés au chapitre	145
2.1. Souches fongiques phytopathogènes	145
2.2. Mesure de la croissance fongique par néphélométrie	145
2.3. Inhibition de la croissance des phytopathogènes en co-cultures.....	146
2.4. Etude <i>in planta</i>	146
2.5. Etude de la production de métabolites par les souches en co-cultures (<i>partie non-incluse dans la publication</i>)	147
3. Etude de l'activité anti-phytopathogène des peptaïbols et de souches marines de <i>Trichoderma</i> sp.	151
3.1. Souches marines de <i>Trichoderma</i> , source potentielle d'agents de biocontrôle - <i>publication 2 (en préparation)</i>	152
3.2. Principales conclusions sur l'activité des peptaïbols <i>in vitro</i>	166
3.3. Principales conclusions de la comparaison des activités d'une souche marine et d'une souche commerciale de <i>Trichoderma</i> en co-cultures avec des phytopathogènes.....	166
3.4. Principales conclusions de l'étude <i>in planta</i>	168
3.5. Activité des nouvelles séries de peptaïbiotiques (15- et 17-résidus) isolées des souches marines – comparaison avec les séries classiques.....	168
4. Etude des interactions chimiques antagonistes <i>Trichoderma</i> sp.-phytopathogènes par une approche métabolomique.....	173
4.1. Métabolites induits diffusés dans la gélose lors des co-cultures.....	174
4.2. Métabolites induits dans le mycélium lors des co-cultures.....	177
5. Conclusion du chapitre.....	182

Chapitre 5 : Analyses qualitative et quantitative des peptaïbols dans les extraits bruts des souches de <i>Trichoderma</i>	183
1. Contexte	184
2. Matériel et méthodes liés au chapitre	185
2.1. Choix des souches	185
2.2. Spectromètres de masse utilisés pour l'analyse qualitative	186
2.3. Solvants utilisés pour l'optimisation de l'extraction des peptaïbols en vue de leur analyse quantitative	188
2.4. Mode de détection et paramètres instrumentaux utilisés pour l'analyse quantitative	188
3. Analyse qualitative de la production de peptaïbols par différentes souches de <i>Trichoderma</i> : influence de l'appareillage utilisé	189
4. Analyse quantitative des peptaïbols dans les extraits bruts de <i>Trichoderma</i>	194
4.1. Optimisation de l'extraction des peptaïbols	194
4.2. Validation de la méthode de quantification et utilisation- <i>Publication 3</i>	196
5. Conclusion du chapitre	206
Conclusion générale et perspectives	209
Références bibliographiques	213
Annexes	233
Annexe 1	234
Annexe 2	249
Annexe 3	250

Liste des figures

Figure 1-1 : Evolution des techniques et faits marquant la classification taxonomique des <i>Trichoderma/Hypocrea</i> , d'après (Druzhinina <i>et al.</i> , 2006).	8
Figure 1-2 : Morphologie des <i>Trichoderma</i> : aspect macroscopique de <i>Trichoderma atroviride</i> (MMS 1513) cultivé sur milieu DCA / eau de mer (27°C), boîte de Petri 10 cm de diamètre.	9
Figure 1-3: Morphologie des <i>Trichoderma</i> : aspect microscopique d'un conidiophore après coloration au rouge Congo. Grossissement : X 400.	9
Figure 1-4 : Schéma d'une vue microscopique de conidiophores et conidies de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	10
Figure 1-5 : Propriétés biostimulantes des <i>Trichoderma</i> , d'après Lopez-Bucio <i>et al.</i> , 2015 (Lopez-Bucio <i>et al.</i> , 2015).....	16
Figure 1-6 : Structure générale des trichotécènes.....	22
Figure 1-7 : Synthèse des peptaïbols à 11 résidus par le mécanisme de "Module skipping" au sein de la NRPS synthétisant les peptaïbols à 14 résidus (Degenkolb <i>et al.</i> , 2012).....	27
Figure 1-8 : Répartition des principaux sous-groupes de peptaïbols, toutes espèces fongiques productrices confondues.(d'après la « peptaibiotics database »).....	30
Figure 1-9 : Représentation d'une hélice α	31
Figure 1-10 : Hélice 3_{10} et α caractérisée par des liaisons hydrogènes (Poirier, 2007)	31
Figure 1-11 : Structure générale d'une conformation en ruban de coude β (Di Blasio <i>et al.</i> , 1992)	32
Figure 1-12 : Modélisation de la formation des canaux transmembranaires par les mécanismes "en douves de tonneau", d'après Brogden, 2005 (Brogden, 2005).....	33
Figure 1-13 : Modélisation de la formation des canaux transmembranaires par les mécanismes "en tapis", d'après Brogden, 2005 (Brogden, 2005)	34
Figure 1-14 : Comparaison schématique du modèle en douve de tonneau (A) et du modèle de pores toriques (B), d'après Yang <i>et al.</i> , 2001 (Yang <i>et al.</i> , 2001).....	35

Figure 1-15 : Formation d'un canal hexamérique (gauche) et octamérique (droite), d'après Duclohier et al. en 2004 (Duclohier <i>et al.</i> , 2004)	36
Figure 1-16 : Voies de fragmentation privilégiées des peptides en spectrométrie de masse MS ⁿ (Poirier, 2007).....	47
Figure 1-17 : Fragments générés par la rupture préférentielle Aib-Pro ((Poirier, 2007))	48
Figure 1-18 : Graphe de filiation pour l'ion [M+Na] ⁺ =1183 caractéristique d'un peptaïbol à 11 résidus ((Ruiz, 2007)).....	49
Figure 2-1: Configuration éclatée du spectromètre de masse à trappe d'ion équipé d'une source d'ionisation électrospray. (image site web CNRS) (cbm.cnrs-orleans.fr, 1999)	58
Figure 2-2: Illustration du phénomène de cône de Taylor, d'après Adam M. Hawkrigde (Hawkrigde, 2014)	59
Figure 2-3: Production de gouttelettes à l'interface de la source électrospray (Kadar, 2011)	60
Figure 2-4: Schéma de la trappe ionique quadripolaire et trajectoire des ions. (image site web doping.chuv(doping.chuv)).	63
Figure 2-5: Principe du multiplicateur d'électrons (D'après J. Flemen, site web de l'université Rennes 1) (Flemen.J).	64
Figure 2-6: Schéma du spectromètre de masse IT-TOF (Schimadzu®)	65
Figure 2-7: Schéma de la configuration orthogonale de la source ESI du spectromètre de masse IT-TOF (d'après le site web de Waters®) (Waters).....	66
Figure 2-8: Analyseur de masse à trappe ionique couplé à un analyseur de masse temps de vol (Shimadzu®).....	67
Figure 2-9: Comparaison du fonctionnement du photomultiplicateur (dynode) et de la galete de microcanaux.	68
Figure 3-1 : Profil MS de l'extrait enrichi en peptaïbols de la souche MMS 1255.....	76
Figure 3-2 : Zoomscan de la zone des 14 résidus (<i>m/z</i> 1465 à 1521) de la souche MMS 1255	77
Figure 3-3 : Chromatogramme HPLC-UV (230 nm) de la fraction 2-10	80
Figure 3-4 : Synthèse des étapes de purification des peptaïbols produits par <i>T. harzianum</i> MMS 1255.....	82

Figure 3-5 : Séquençage du peptide élué dans la fraction HPLC 2-10-6. a) Spectre MS ² de l'ion [M + Na] ⁺ m/z 1492,8 en ionisation positive ; b) Spectre MS ² de l'ion [M – H] ⁻ m/z 1468,8 en ionisation négative	83
Figure 3-6 : Graphe de filiation des ions fragments obtenus par fragmentations MS ² pour le peptide de la fraction 2-10-6.....	85
Figure 3-7 : Spectre de RMN 1D ¹ H de la séquence TH-15-IIb (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , 298K), a) région des protons amides (9 – 6,5 ppm) ; b) région des protons α, β, γ, δ (4,8 – 0,5 ppm)	87
Figure 3-8 : Spectre 2D-HMBC de la séquence TH-15-IIb. Agrandissement de la région des carbonyles 180-170 ppm (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , 298K)	90
Figure 3-9 : Spectre 2D-NOESY de la séquence TH-15-IIb. Agrandissement de la région des protons amides 9-6,5 ppm (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , 298K)	91
Figure 3-10 : Structure du peptaïbol TH-15-IIb avec les corrélations HMBC (→) et NOESY (---) ...	92
Figure 3-11 : Chromatogramme HPLC-UV (340 nm) du mélange des acides aminés standards de configuration <i>L</i> et <i>D</i> après dérivation par le réactif Marfey	93
Figure 3-12 : Chromatogramme HPLC-UV (340 nm) des acides aminés du peptaïbol TH-15-IIb ..	94
Figure 3-13 : Comparaison des spectres UV de la <i>L</i> -Val (a) et du composé élué à 25,7 min (b) ...	95
Figure 3-14 : Spectre de RMN 1D ¹ H de la fraction 2-4-1 (500 MHz ; MeOH- <i>d</i> ₄ ; 298K)	116
Figure 3-15 : Chromatogrammes HPLC-MS des acides aminés de l'hydrolysate de la fraction 2-4-3	118
Figure 3-16 : Schéma réactionnel possibles de l'hydrolyse acide sur les résidus C-terminaux...	119
Figure 3-17 : Chromatogramme GC-MS des acides aminés dérivés de l'hydrolysate de la	120
Figure 3-18 : Hypothèses de schémas réactionnels de la dérivation en esters N-trifluoroacétyl-isopropyle des acides aminés envisagés comme étant le résidu C-terminal C ^[129]	122
Figure 3-19 : Schéma réactionnel de l'estérification des acides aminés envisagés comme étant le résidu C-terminal C ^[129]	124
Figure 3-20 : Spectres de masse de la fraction 2-4-3 a) avant et b) après méthanolyse chlorhydrique	125
Figure 3-21 : Modifications de séquence, après méthanolyse chlorhydrique, déterminées pour l'ion [M+2Na] ²⁺ m/z 838	126

Figure 3-22 : Informations structurales découlant des réactions de méthanolyse acide	127
Figure 3-23 : Spectres de masse de la fraction 2-4-3 a) avant et b) après éthanolyse chlorhydrique	128
Figure 3-24 : Modification de séquence, après éthanolyse chlorhydrique, déterminées pour l'ion $[M+2Na]^{2+}$ m/z 838	128
Figure 3-25 : Hypothèse de protection de la fonction aldéhyde C-terminale par l'éthylène glycol	129
Figure 3-26 : Spectres de masse de la fraction 2-4-3 a) avant et b) après réaction avec l'éthylène glycol.....	130
Figure 3-27 : Modifications de séquence, après réaction avec l'éthylène glycol, déterminées pour l'ion $[M+2Na]^{2+}$ m/z 838.....	130
Figure 3-28 : Hypothèse de réaction de l'éthylène glycol sur le glutaminal (+89 u)	131
Figure 3-29 : Bilan des modifications structurales proposées pour un glutaminal C-terminal ...	132
Figure 4-1 : Principe de la néphélométrie laser	145
Figure 4-2 : Schéma de confrontation antagoniste-pathogène.....	146
Figure 4-3 : Protocole de culture et co-culture <i>Botrytis cinerea</i> - <i>Trichoderma</i> et prélèvements	148
Figure 4-4 : Pourcentage d'inhibition de croissance observé pour les pathogène <i>A. brassicicola</i> et <i>B. cinerea</i> en présence des différentes longueurs de peptaïbiotiques testés à 50 µg/mL. Barres d'erreur = écart type. Comparaisons statistiques par ANOVA	169
Figure 4-5 : A) Représentation schématique des différentes familles testées de peptaïbols. La présence d'une Proline(P) induit un coude dans la structure. Les résidus glutamine (Q) qui jouent un rôle dans la stabilisation des structures formées au niveau transmembranaire sont indiqués. B) structure de l'alaméthicine, peptaïbol à 20 résidus montrant la courbure de l'hélice produite par la proline (d'après http://peptaibol.cryst.bbk.ac.uk/alamethicin1.htm). C) Formation des pores dans la bicouche lipidique par association de molécules de peptaïbols (d'après (Galbraith <i>et al.</i> , 2003)).....	171
Figure 4-6 : Graphique en volcan obtenu pour les prélèvements de géloses à 3 jours d'incubation. Fold change > 3, p -value ≤ 0,05. En vert, les métabolites induits et diffusés dans la gélose.	175

Figure 4-7 : Graphique en volcan obtenu pour les prélèvements de mycélium du champignon <i>Botrytis cinerea</i> en co-culture face au <i>Trichoderma</i> MMS 927 à 3 jours d'incubation. « Fold change » > 3, p -value < 0,05. En vert, les métabolites induits et en rouge les réprimés.	178
Figure 4-8 : Graphique en volcan obtenu pour les prélèvements de mycélium du champignon <i>Trichoderma</i> MMS 927 en co-culture face au <i>Botrytis cinerea</i> à 3 jours d'incubation. « Fold change » > 3, p -value < 0,05. En vert, les métabolites induits et en rouge les réprimés.	180
Figure 5-1 : Schéma de l'analyseur de masse quadripolaire, d'après le site web gcms.free.fr (www.gcms.free.fr, 2006)	187
Figure 5-2 : Spectres de masse full scan de l'extrait VLC (90:10; v/v) de la souche MMS 852 (<i>T. harzianum</i>). Profil observé sur les spectromètres de masse a) LCQ™, b) simple quadripôle, c) IT-TOF.	190
Figure 5-3 : Spectres de masse zoomés sur les masses caractéristiques des peptaïbols à 11 résidus de l'extrait VLC (90:10; v/v) de la souche MMS 755 (<i>T. capillare</i>). Profil observé sur les spectromètres de masse a) LCQ™, b) simple quadripôle, c) IT-TOF.	191
Figure 5-4 : spectres de masse zoom scan de la région des peptaïbols à 18 résidus observés sur le spectromètre de masse LCQ™ pour a) MMS 13 (<i>T. harzianum</i>) et b) MMS 1541 (<i>T. pleuroticola</i>). Une série d'ions caractéristiques est repérée par une couleur de m/z	193
Figure 5-5 : Masses des peptaïbols rapportées à la masse de la biomasse fongique fraîche extraite en fonction du solvant ou du mélange de solvant utilisé pour l'extraction.....	195
Figure A1-1 : Spectre RMN 2D-COSY du peptaïbol TH-15-IIb	235
Figure A1-2 : Spectre RMN 2D-TOCSY du peptaïbol TH-15-IIb (600 MHz, DMSO- d_6 , 298K).....	236
Figure A1-3 : Spectre RMN 2D-HSQC proton 4,5-1,0 ppm/carbone 70-10 ppm du peptaïbol TH-15-IIb (600 MHz, DMSO- d_6 , 298K).....	237
Figure A1-4 : Spectre RMN 2D- HMBC carbone 66-50 ppm / proton 9-0,5 ppm du peptaïbol TH-15-IIb (600 MHz, DMSO- d_6 , 298K).....	238
Figure A1-5 : Spectre RMN 1D- ^1H du peptaïbol TH-15-IIIa	240
Figure A1-6 : Spectre RMN 2D-COSY du peptaïbol TH-15-IIIa	241
Figure A1-7 : Spectre RMN 2D-TOCSY du peptaïbol TH-15-IIIa.....	242
Figure A1-8 : Spectre RMN 2D-NOESY région des protons amides du peptaïbol TH-15-IIIa	243

Figure A1-9 : Spectre RMN 2D- HSQC carbone 10-70/ proton 1-4 ppm du peptaïbol TH-15-IIIa	244
Figure A-10 : Spectre RMN 2D-HMBC carbone 170-180 ppm / proton 0,5-9 ppm du peptaïbol TH-15-IIIa (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , 298K)	245
Figure A1-11 : Spectre RMN 2D-HMBC carbone 51-64 ppm / proton 0,5-9 ppm du peptaïbol TH-15-IIIa (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , 298K)	246
Figure A1-12 : Structure du peptaïbol TH-15-IIIa avec les corrélations HMBC (→) et NOESY (---)	248
Figure A2-13 : Séquence du gène <i>tef1</i> de l'ADN de la souche MMS 1255.	249
Figure A3-14 : Modifications structurales du résidu Gln ₆ des peptaïbiotiques à 17 résidus produits par <i>T. atroviride</i> MMS 927	250

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Les différents sous-groupes de peptaïbiotiques et leurs caractéristiques	25
Tableau 2-1: Souches de <i>Trichoderma</i> sélectionnées et citées dans les différents chapitres de ce manuscrit.....	53
Tableau 2-2: Composition des milieux de cultures	55
Tableau 3-1 : Gradient utilisé pour la séparation des acides aminés standards dérivés.....	72
Tableau 3-2 : Bilan massique du fractionnement de la fraction 2 par chromatographie liquide sur colonne ouverte de gel de silice.....	78
Tableau 3-3 : Séquences observées des peptaïbols à 11 et 14 résidus produits par <i>T. harzianum</i> MMS 1255	79
Tableau 3-4 : bilan massique de l'étape de purification par HPLC de la fraction 2-10.....	81
Tableau 3-5 : Résultats de l'étape de purification par HPLC de la fraction 2-10	81
Tableau 3-6 : Séquences des peptaïbols à 15 résidus produits par <i>Trichoderma harzianum</i> MMS1255	86
Tableau 3-7 : Composition en acides aminés des peptaïbols à 15 résidus	95
Tableau 3-8 : Bilan des séquences peptidiques des peptaïbols TH-15-I à IIIb avec assignation des isomères	97
Tableau 3-9 : Temps de rétention obtenus pour les acides aminés de l'hydrolysate de la fraction 2-4-6-3 sur colonne Kromasil C ₁₈	117
Tableau 3-10 : Transformation des peptaïbiotiques à 17 résidus de la fraction 2-4-3 après méthanolyse chlorhydrique	125
Tableau 3-11 : Bilan des dérivations chimiques effectuées sur les peptaïbiotiques à 17 résidus de la fraction 2-4-3	133
Tableau 3-12 : Alignement et homologues de séquences des peptaïbols à 15 résidus et des peptaïbiotiques à 17 résidus avec les peptaïbols à 11, 14, 18, 19 et 20 résidus	136
Tableau 3-13: Comparaison des modèles de séquences des peptaïbols à 15 résidus et des trichorzines.....	138

Tableau 3-14 : Comparaison des modèles de séquences des peptaïbols à 15 et 18 résidus et hypothèses de biosynthèse commune	139
Tableau 4-1 : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse par HPLC-HRMS	149
Tableau 4-2 : Croissance des souches de <i>Trichoderma</i>	167
Tableau 4-3 : Comparaison de différents critères chiffrables sur les séquences des peptaïbols testés par rapport aux inhibitions provoquées sur les deux phytopathogènes	172
Tableau 4-4 : Caractéristiques des métabolites décrits comme induits graphiquement et sécrétés dans la gélose. « Fold change » > 3, p -value $\leq 0,05$	176
Tableau 4-5 : Caractéristiques des métabolites décrits comme induits graphiquement chez <i>Botrytis</i> . « Fold change » > 3, p -value $\leq 0,05$	178
Tableau 4-6 : Caractéristiques des métabolites décrits comme réprimés graphiquement chez <i>Botrytis</i> . « Fold change » < 1/3, p -value $\leq 0,05$	179
Tableau 4-7: Caractéristiques des métabolites décrits comme induits graphiquement chez <i>Trichoderma</i> . « Fold change » > 3, p -value $\leq 0,05$	181
Tableau 5-1 : Production qualitative des peptaïbols par les 13 souches de <i>Trichoderma</i> choisies	192
Tableau 5-2 : Polarité des solvants et mélanges de solvants utilisés pour l'extraction des peptaïbols.....	194
Tableau A1-0-1: Ions fragments diagnostiques des peptaïbols à 15 résidus produits par <i>Trichoderma harzianum</i> (MMS 1255)	234
Tableau A1-0-2 : Données RMN ^{13}C et ^1H du peptaïbol TH-15-IIb (600 MHz, DMSO- d_6 , 298 K)	239
Tableau A1-0-3 : Données RMN ^{13}C et ^1H du peptaïbol TH-15-IIIa (600 MHz, DMSO- d_6 , 298 K)	247

Liste des abréviations

A : Adénylation
Ac : Acétyl
ACN : acétonitrile
AcOEt : acétate d'éthyle
AF : acide formique (CH_3COOH)
Aib : Acide α -aminoisobutyrique
BCA : agent de biocontrôle (biocontrol agent)
C : Condensation
CCM : chromatographie sur couche mince
CE50 : Concentration efficace entraînant 50% d'anomalies larvaires CID *Ion source collision induced dissociation*
CH₂ Cl₂ : dichlorométhane
CID : Collision induced dissociation
CLBP : chromatographie liquide basse pression
CLV : chromatographie liquide sous vide
CMI : Concentration minimale inhibitrice
composé ciblé a été successivement fragmenté (fragmentations successives multi-étages)
COSY : corrélations en RMN 2D entre des protons couplés de façon scalaire (2J HH ,3J HH, protons portés par des carbones voisins) (CORrelation Spectrometry)
CRIOBE : Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de l'Environnement
CRM : *Consecutive reaction monitoring*
DCA : Dextrose - extrait de caséine - agar (milieu de culture fongique)
DL50 : Dose entraînant la mort de 50% des individus
DMSO-d₆ : diméthyl sulfoxyde deutéré
DNP : Dictionary of Natural Product, base de données de produits naturels
ED : eau distillé
EDM : eau de mer
ESI : ionisation par électrospray (Electrospray Ionization)
EtOH : éthanol
FAB : *Fast atom bombardement*
FDA : 1-fluoro-2-4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide
Fol : Phénylalaninol
GC : Chromatographie en phase gazeuse (gaz chromatographie)
H₂O : eau
HCl : acide chlorhydrique
HMBC : en RMN 2D interaction longue distance ^1H - ^{13}C ($^2J_{\text{CH}}$, $^3J_{\text{CH}}$ voire $^4J_{\text{CH}}$) (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
HPLC : chromatographie liquide à haute performance (high performance liquid chromatography)
HPLC : Chromatographie liquide à haute pression (high pressure liquid chromatography)
HR-MS : spectrométrie de masse haute résolution (high resolution mass spectrometry)
HSQC : met en évidence en RMN 2D les interactions ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
IC₅₀ : concentration inhibitrice médiane
IFREMER : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer lol Isoleucinol

IT : Trappe Ionique (Ionic trap)
ITS : régions non-codantes espaçant les gènes ribosomaux (Internal Transcribed Spacer)
Ivaol : Isovalinol
Jol : Isovalinol
KB : lignée cellulaire issues du carcinome oral humain
LABERCA : Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminant dans les Aliments
LASER : Amplification de la lumière par émission stimulée de radiation.(Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation)
LC : chromatographie liquide (LiquidChromatography)
LC-MS : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (Liquid Chromatography
LOD : Limite de détection (limit of detection)
Lol : Leucinol
LOQ : Limite de quantification (limit of quantification)
Lxx/Lx : Leucine/Isoleucine
Lxxol/ Lxol : Leucinol/Isoleucinol
M : Masse moléculaire
m/z : rapport masse sur charge d'un composé ionisé en MS
MALDI : Matrix assisted laser desorption ionization
 Mass Spectrometry)
MeOH : Méthanol
MeOH-d₄ : Méthanol deutéré
MMS : laboratoire Mer, Molécules, Santé
MS : spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
MS/MS : MS²
MSⁿ : fragmentation en spectrométrie de masse, avec n caractérisant le nombre de fois où le
N : molarité
N₂ : diazote
NaHCO₃ : Bicarbonate de sodium
NaOH : soude (hydroxyle de sodium)
Nd : non déterminé
NOESY : en RMN 2D, interaction dipolaire (spatiale) entre deux protons (¹H-¹H) (Nuclear
NRPS : enzymes de synthèse des peptides non ribosomiques (Non-Ribosomal Peptides
OSMAC : culture d'une souche fongique sur différent milieux (One Strain-Many Compounds)
 Overhauser Effect Spectroscopy)
PDA : Potato Dextrose Agar (Extrait de pomme de terre - agar ; milieu de culture)
PDB : Potato Dextrose Broth (Extrait de pomme de terre ; milieu de culture)
Pheol : Phénylalaninol
PKS : polycétide synthase
ppm : partie par million
QC : contrôle qualité (Quality Control)
RMN : résonance magnétique nucléaire
RMN 1D : résonance magnétique nucléaire à une dimension
RMN 2D : résonance magnétique nucléaire à deux dimensions
RT : temps de rétention
SIM: Selected ion monitoring
SPE Solid phase extraction
SRM Selected reaction monitoring Synthetase)
T: Thiolation

TFA : Acide trifluoroacétique
TFAA : anhydride trifluoroacétique
TIC : courant ionique total
TIC : Courant ionique total
TOCSY : met en évidence des interactions entre protons appartenant à un même système de spins en RMN 2D (J_{HH})
TOF : temps de vol (Time Of Flying)
Trp_{ol} : Tryptophanol
U : Acide α -aminoisobutyrique
UA: Unité arbitraire
UHPLC: chromatographie liquid haute performance (Ultra high performance liquid chromatography)
UV : ultra violet (en nm)
v/v : volume pour volume
Val_{ol}/V_{ol} Valinol
VLC : chromatographie liquide sous vide (vacuum liquide chromatography)
V_{xx}/V_x : Valine/Isovaline
V_{xxol}/V_{xol} : Valinol/Isovalinol
W_{ol} : Tryptophanol

Introduction générale

Depuis quelques années, le développement d'une politique de respect de l'environnement a conduit à rechercher des alternatives aux traitements chimiques des végétaux dans un souci de réduction de l'utilisation des pesticides. Le biocontrôle, qui consiste en l'utilisation d'organismes vivants pour lutter contre les phytopathogènes, pourrait être une réponse à cette demande. Des premiers agents de biocontrôle ont été sélectionnés et sont commercialisés. Ce sont en particulier des souches fongiques du genre *Trichoderma* qui présentent une forte activité contre les pathogènes. Il s'agit, à l'heure actuelle, uniquement de souches ayant une origine terrestre. La recherche de nouvelles souches concurrentes est aujourd'hui nécessaire. Dans ce but, le milieu marin pourrait être un réservoir de nouveaux agents de biocontrôle.

Historiquement, le laboratoire MMS s'intéresse à la mycologie marine. Suite à plusieurs épisodes inexpliqués de toxicité et de mortalité de coquillages sur les côtes françaises et suite à l'hypothèse formulée par le laboratoire d'une contamination fongique possible, une collection de souches de champignons filamenteux isolés des zones conchylicoles a été constituée. Elle contient de nombreuses souches relevant de différents genres fongiques et en particulier plus de dix pour cent d'entre elles sont des champignons du genre *Trichoderma*. Cette collection pourrait donc être une source importante pour la recherche de nouveaux agents de biocontrôle. C'est ce qui a constitué la question de départ de ce travail.

Le mode d'action des *Trichoderma* utilisés comme agents de biocontrôle n'est pas encore totalement élucidé. Ils sont utilisés soit pour parasiter directement le pathogène ou bien en temps que promoteur de croissance de la plante traitée. Néanmoins une action antifongique de leurs métabolites pourrait être responsable en partie de leur activité. Différentes études réalisées dans ce domaine ont montré que les peptaïbols, peptides linéaires particuliers produits par ces champignons, possédaient de nombreuses activités biologiques du fait de leur capacité à former des pores dans les membranes constituées d'une bicouche lipidique. Ils ont ainsi été supposés intervenir dans l'activité des *Trichoderma* du fait d'un certain pouvoir antifongique. Or, différentes études menées sur les *Trichoderma* marins ont montré qu'ils produisaient une grande variété de ces peptaïbols. Nous avons donc voulu savoir si leur pouvoir antifongique vis-à-vis des phytopathogènes était effectif et si leur production par les souches marines pouvait être un facteur à prendre en compte.

Dans cette optique de déterminer des critères pour la sélection de nouveaux agents valorisables en biocontrôle, nous avons étudié la production des peptaïbols par des souches marines de *Trichoderma*, identifié de nouvelles séries peptidiques, étudié leur activité antifongique vis-à-vis de phytopathogènes et avons développé une méthode analytique pour leur quantification dans les extraits fongiques. L'ensemble des résultats obtenus sur ces points sont présentés dans ce mémoire à la suite d'une étude bibliographique rappelant les connaissances actuelles sur les *Trichoderma*, leur utilisation en biocontrôle et sur les peptaïbols et leurs activités.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

1. Les *Trichoderma*

Le terme « *Trichoderma* » a été défini pour la première fois en 1794 par Persoon (Persoon, 1794). Il désigne des champignons saprotrophes présents aussi bien dans le sol, que sur des matières végétales en décomposition ou en milieu marin. Les *Trichoderma* sont également retrouvés dans la rhizosphère des plantes où ils peuvent induire une réaction systémique contre les phytopathogènes (Harman, 2000). Ce sont des champignons filamenteux supérieurs appartenant au sous-embranchement des Ascomycètes du genre *Trichoderma* /*Hypocrea* (Kubicek *et al.*, 2008).

En milieu terrestre, leur production d'enzymes, de métabolites secondaires et leur développement rapide font des *Trichoderma* une source potentielle d'agents pour une utilisation industrielle (Druzhinina *et al.*, 2006). En effet, leurs métabolites ont un intérêt en tant que composés aromatiques dans l'industrie agroalimentaire. Les *Trichoderma* sont également impliqués dans la production de biofuels grâce à leur capacité à dégrader les matières organiques (Kumar *et al.*, 2008; Kubicek *et al.*, 2009; Mukherjee, 2013). Parmi ces espèces, certaines sont utilisées pour leur production d'enzymes cellulolytiques (cellulases et hemicellulase) pour une application dans la fabrication de pâte à papier, ainsi que dans l'industrie textile (Schuster and Schmoll, 2010). Les *Trichoderma* sont également connus comme producteurs de molécules aux propriétés antimicrobiennes. Ainsi certaines espèces de *Trichoderma* peuvent être utilisées en biocontrôle sur des agents phytopathogènes des genres *Fusarium*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Verticillium* ou *Botrytis* (El Komy *et al.*; Benitez *et al.*, 2004; Druzhinina *et al.*, 2006; Lorito *et al.*, 2010; Schuster and Schmoll, 2010; Vos *et al.*, 2014). Ces champignons sont aussi capables d'assainir l'environnement en captant les métaux lourds, les toxines et les xénobiotiques (Harman, 2006). L'usage de *Trichoderma* a été proposé pour la bioremédiation des sols contaminés par le cyanure et les hydrocarbures (Ezzi and Lynch, 2005). En milieu marin, les *Trichoderma* ont été suspectés d'être à l'origine d'épisodes de toxicité pouvant expliquer les phénomènes de mortalité chez les bivalves de la côte atlantique (Sallenave-Namont *et al.*, 2000; Landreau *et al.*, 2002; Poirier *et al.*, 2007). Ils peuvent produire des mycotoxines comme c'est le cas de *Trichoderma brevicompactum* (Tijerino *et al.*, 2011). De

plus, les extraits fongiques de certaines espèces de *Trichoderma* se sont avérés neurotoxiques sur les larves de diptères (Sallenave *et al.*, 1999).

1.1. Caractéristiques

1.1.1. Taxonomie

De nombreuses espèces de *Trichoderma* /*Hypocrea* ont été découvertes au fil des années, et depuis 2014, 250 espèces ont été répertoriées dans le genre *Trichoderma* (Degenkolb *et al.*, 2015). La taxonomie des *Trichoderma* est présentée ci-dessous.

Règne : Fungi

Embranchement : *Eumycota*

Sous-embranchement : *Ascomycotina*

Classe : Sordariomycetes

Ordre : Hypocréales

Famille : *Hypocreacea*

Genre : *Trichoderma*/*Hypocrea*

Les espèces de *Trichoderma* (anamorphes) et leurs téléomorphes (forme sexuée), les *Hypocrea*, sont classées parmi les Ascomycètes (Kubicek *et al.*, 2003; Kubicek *et al.*, 2008). Beaucoup d'études sur la division du genre *Trichoderma* en espèces ont été réalisées, rendant difficile de trouver un consensus général sur leur classification. Dans le règne vivant, les limites de l'espèce reposent sur la possibilité de croisement entre individus. Cependant les champignons anamorphes (forme asexuée) dont font partie les *Trichoderma* n'ont, par définition, pas de reproduction sexuée. Le classement des espèces est alors basé sur les aspects macroscopiques, la morphologie des appareils sporogènes, ainsi que sur le matériel génétique, en s'appuyant sur des techniques de biologie moléculaire (Druzhinina and Kubicek, 2005; Druzhinina *et al.*, 2006). En 1991, Bissett propose la notion de section pour classer le nombre croissant de nouvelles espèces de *Trichoderma*. Cinq sections sont alors définies, basées sur la morphologie des conidiophores et des phialides : *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum* (Bissett, 1991). La classification de Bissett s'appuie également sur une approche d'amplification du génome de la souche utilisant la PCR (*polymerase chaine reaction*).

L'identification des souches est basée sur des similitudes de séquences de zones spécifiques de l'ADN. L'évaluation de leur phylogénie a fait l'objet de nombreuses études. La figure ci-dessous (Figure 1-1) représente la chronologie des différents faits marquants de l'étude taxonomique des *Trichoderma* (Druzhinina *et al.* 2006).

Depuis 2005, l'avancée des études de séquençage du génome a permis une plus grande maîtrise de la classification des espèces de *Trichoderma*. L'amplification et le séquençage des espaceurs transcrits internes (ITS) de l'ADN ribosomal permettent une première approche de classification de la souche étudiée. En effet, les premières études conduites ont porté sur le séquençage des ITS 1, puis plus tard sur le séquençage des ITS 2 ainsi que du gène 5,8S (Mukherjee, 2013). Néanmoins, les ITS ne permettent pas d'obtenir une résolution suffisante pour l'étude phylogénétique, mais constituent une bonne base pour l'attribution des codes-barres par comparaison à une base de données telle que TrichOKey pour les espèces les plus fréquentes (Druzhinina and Kubicek, 2005). Le séquençage d'un gène particulier (*tef1*) en permet l'identification plus fine, pouvant aller jusqu'à l'espèce (Druzhinina *et al.*, 2006).

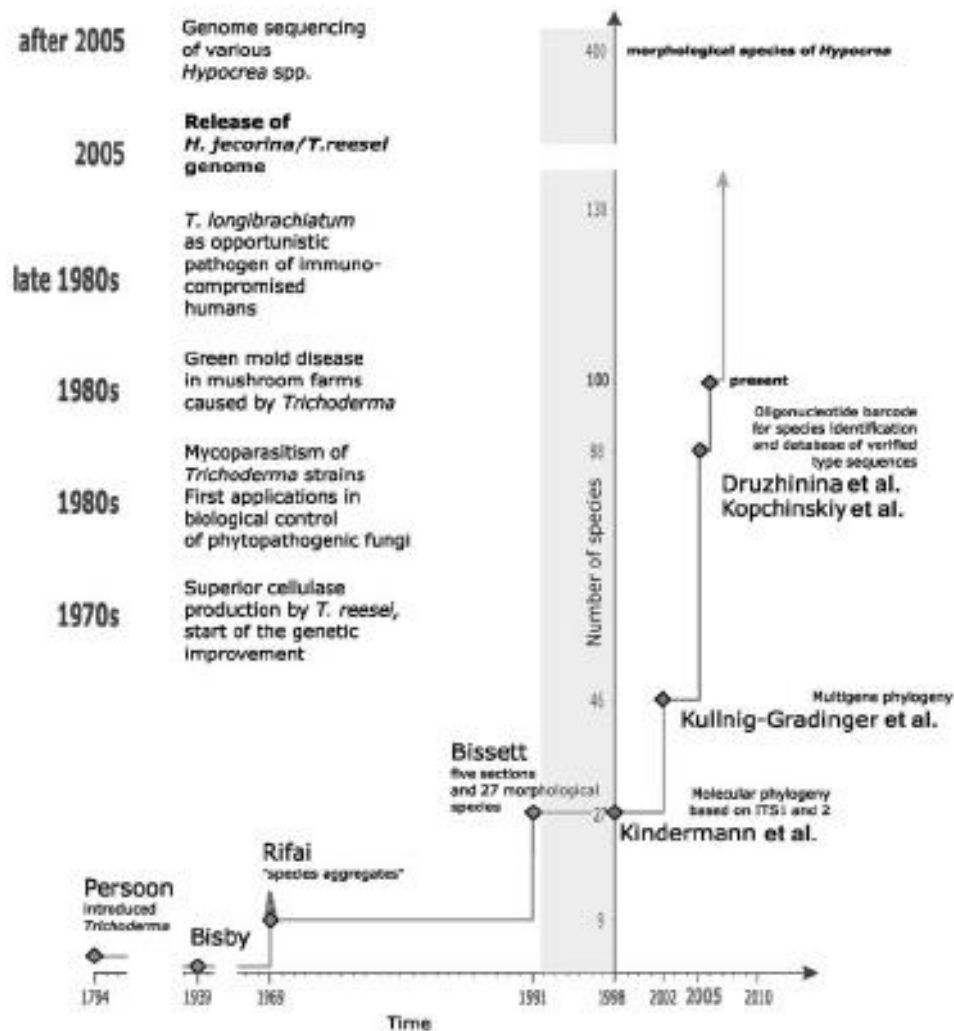


Figure 1-1 : Evolution des techniques et faits marquant la classification taxonomique des *Trichoderma/Hypocrea*, d'après (Druzhinina et al., 2006).

1.1.2. Morphologie

L'aspect macroscopique des *Trichoderma* est observé à partir de cultures fongiques en boîtes de Petri sur milieux gélosés. Ils sont caractérisés par une croissance rapide, avec un aspect d'abord lisse, puis floconneux à un stade avancé, dû à la formation d'hyphes aériens. Ils présentent des conidiophores très ramifiés et une succession de cercles blancs et verts due à la croissance séquentielle du mycélium et à la conidiogénèse. En effet, cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile, qui devient vert deux jours plus tard (Figure 1-2).



Figure 1-2 : Morphologie des *Trichoderma* : aspect macroscopique de *Trichoderma atroviride* (MMS 1513) cultivé sur milieu DCA / eau de mer (27°C), boîte de Petri 10 cm de diamètre.

Au microscope optique, on peut observer le mycélium composé d'hyphes septés, ramifiés et à parois lisses (Figure 1-3).



Figure 1-3: Morphologie des *Trichoderma* : aspect microscopique d'un conidiophore après coloration au rouge Congo. Grossissement : X 400.

Greffés sur les hyphes, les conidiosphores, de forme conique ou pyramidale, portent des phialides en forme de flasques ou de quilles (Figure 1-4). Les phialides, quant à elles, portent les spores (phialospores ou conidies).

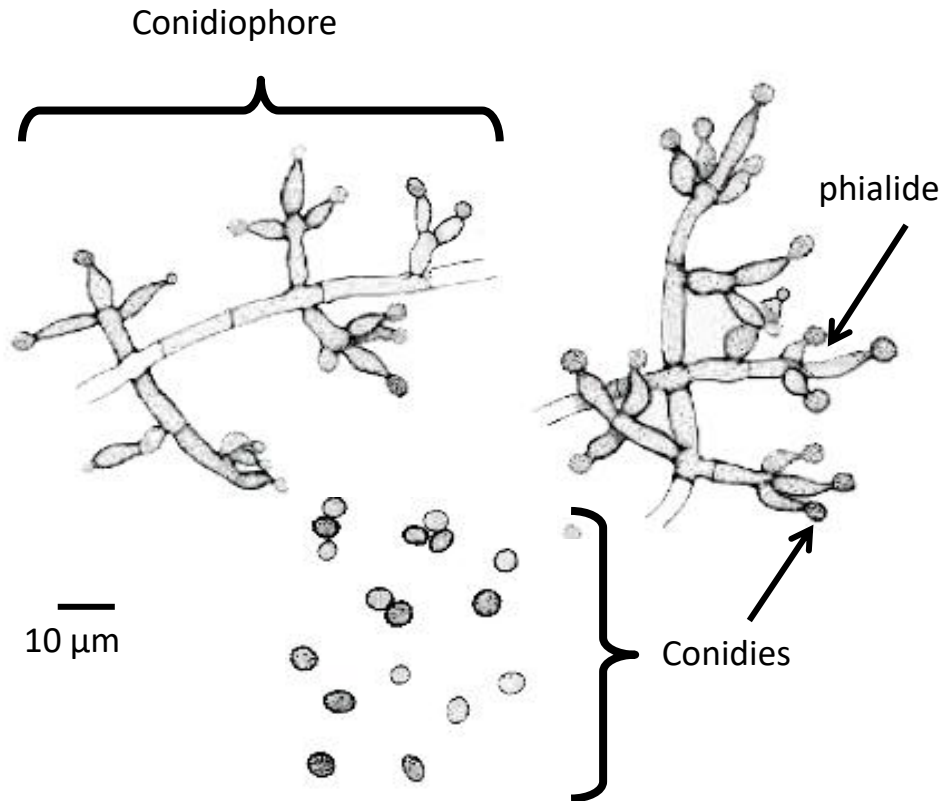


Figure 1-4 : Schéma d'une vue microscopique de conidiophores et conidies de *Trichoderma longibrachiatum*

1.1.3. Ecologie

Un inventaire des souches fongiques marines du littoral atlantique a révélé que le genre *Trichoderma* y était l'un des 3 genres fongiques prédominants après les genres *Penicillium* et *Aspergillus* (Sallenave-Namont *et al.*, 2000). La présence des *Trichoderma* en milieu marin (6,4 à 10,4% des espèces recensées) est comparable à celle en milieu terrestre (6% des espèces recensées) (Landreau, 2001). Les *Trichoderma* sont, par conséquent, une des espèces majeures des champignons terrestres et marins (Kubicek *et al.*, 2003; Kubicek *et al.*, 2008).

Cette importante présence, aussi bien en milieu terrestre que marin, est possible grâce à de grandes facultés d'adaptation aux conditions climatiques, une croissance rapide et une capacité à utiliser différents substrats. L'abondance des *Trichoderma* dans les écosystèmes est également due à leur capacité à produire de nombreux métabolites bioactifs et des enzymes.

Dans les milieux terrestres, les *Trichoderma* se développent dans quasiment tous les sols et sur les végétaux en décomposition. Ils contaminent fréquemment les cultures industrielles de champignons comestibles, mais sont rarement parasites des plantes vivantes (Kubicek *et al.*, 2008). Quant au milieu marin, les *Trichoderma* ont été retrouvés dans des échantillons d'éponges, de mollusques, de sédiments, d'eau de mer ou encore d'algues (Mukherjee, 2013).

1.2. Interaction des *Trichoderma* avec l'Homme

Les *Trichoderma* sont rarement pathogènes de l'Homme mais, en cas de diminution des défenses immunitaires du patient, des cas pathologiques peuvent se développer. Ainsi, plusieurs espèces de champignons des sections *Longibrachiatum*, *Pachybasium* B et *Trichoderma* ont été retrouvées dans des échantillons cliniques humains (Mukherjee, 2013). Sandoval-Denis *et al.* (2014) ont également relevé des infections par *Trichoderma longibrachiatum* et *Trichoderma orientale* sur sujets humains (Sandoval-Denis *et al.*, 2014). De plus, trois cas cliniques d'infection par *Trichoderma harzianum* ont été rapportés (Degenkolb *et al.*, 2015). Le premier cas était associé à une péritonite causée par une dialyse péritonéale sur un patient diabétique, le second a été rapporté chez un patient transplanté rénal et le troisième a été décrit chez un jeune patient leucémique. L'issue fatale de ces trois cas peut être attribuée à la résistance des souches à l'antimycosique appliqué et à la prédisposition des patients, respectivement pour cause de dialyse péritonéale ambulatoire chronique (DPCA), de transplantation d'organe et de troubles hématologiques. Ces prédispositions ont été récemment inscrites comme étant les trois principaux facteurs de risque pour une infection aux *Trichoderma* (Degenkolb *et al.*, 2015). L'infection par le virus du sida (HIV) peut également être un facteur augmentant le risque de maladie causée par les *Trichoderma* (Mukherjee, 2013).

Parmi les infections aux *Trichoderma* rapportées, le système respiratoire est le plus fréquemment touché. En effet, les *Trichoderma* ont été mentionnés comme polluants de l'air intérieur (Druzhinina *et al.*, 2006). En 1976, Escudero *et al.* ont décrit l'infection d'un patient par un mycétome pulmonaire causée par *Trichoderma viride* (Escudero Gil *et al.*, 1976). Une souche du genre *Trichoderma/Hypocrea* a également été isolée chez un patient atteint d'une fibrose pulmonaire (Druzhinina *et al.*, 2007). Plusieurs espèces de *Trichoderma* ont été décrites comme

pouvant être impliquées dans des réactions allergiques (Burge, 1985; Vesper *et al.*, 2007) ou dans l'asthme chez l'adulte (Quansah *et al.*; Hyvärinen *et al.*, 2001). Mais les infections à *Trichoderma* peuvent également toucher les os (Gautheret *et al.*, 1995), le sang (Druzhinina *et al.*, 2008), le système digestif, la peau, les reins, le cœur, le foie (Stelzmueller *et al.*, 2008), les yeux (Kredics *et al.*, 2015) ou le cerveau (Seguin *et al.*, 1995).

Les principales sources de contamination seraient :

- l'air disséminant les conidies des souches de *Trichoderma* impliquées, principalement, dans les réactions d'allergies respiratoires (Colakoglu, 2003),
- les eaux de surfaces transportant, par exemple, les conidies des souches décrites comme ayant un rôle dans les infections de la peau (Hageskal *et al.*, 2006),
- la nourriture véhiculant les souches de *Trichoderma* mises en cause, entre autre, dans les infections du système gastrique (Bouakline *et al.*, 2000). Des conidies de *T. longibrachiatum* et *T. harzianum* ont été retrouvés dans le compost servant à la culture de champignons comestibles en Hongrie (Hatvani *et al.*, 2007).

1.3. Utilisation en biocontrôle

Les *Trichoderma* produisant de nombreux métabolites antibiotiques, leur utilisation potentielle comme agent de biocontrôle (BCA) a été investiguée dès le début des années 1930 (Weindling, 1934), mais la majorité des études sur le sujet a été réalisée depuis la fin des années 1990 (Harman and Kubicek, 1998; Harman, 2000). Actuellement, 60% des biofongicides commercialisés sont formulés à base de *Trichoderma* (Verma *et al.*, 2007). En Inde, 250 formulations à base de *Trichoderma* sont commercialisées (Singh H.B., 2012).

Le biocontrôle résulte d'une compétition pour des substances nutritives et pour la colonisation de l'espace. Il résulte en conséquence :

- de la capacité des *Trichoderma* à résister aux métabolites produits par des pathogènes, qui empêchent la germination de leurs spores (fongistase), tuent leurs cellules (antibiose) ou modifient leur rhizosphère,
- de la capacité des *Trichoderma* à produire des molécules ayant des actions similaires sur les pathogènes ciblés. Les métabolites produits par certains *Trichoderma* peuvent agir, par exemple, en acidifiant le sol pour que les pathogènes ne puissent pas se développer. La

stratégie de biocontrôle peut aussi résulter d'une interaction directe entre le pathogène et l'agent de biocontrôle, comme dans le mycoparasitisme, qui implique le contact physique et la synthèse d'un mélange de molécules agissant de manière synergique telles que des enzymes hydrolytiques, des composés toxiques et des molécules antimicrobiennes.

Les *Trichoderma* peuvent également exercer des effets positifs sur certaines plantes soit en augmentant leur croissance (biofertilisation) (Harman *et al.*, 2004; Shores *et al.*, 2010), soit en stimulant des mécanismes de défense (Benitez *et al.*, 2004; Harman, 2006). Certaines souches de *Trichoderma* sont contenues dans des produits commerciaux de lutte biologique contre les pathogènes des plantes. Au sein de ces produits commerciaux, la distinction doit être faite entre :

- les BCA au sens strict, qui ont une action antagoniste directe sur une gamme définie de pathogènes des plantes,
- les promoteurs de croissance appliqués sur des formulations en granules ou en poudres ajoutés dans le sol ou solubilisés dans l'eau. Ces derniers sont recommandés pour la culture des légumes ou des plantes d'ornement et permettent i) la protection prophylactique des plantes et plantules contre les champignons pathogènes; ii) la stimulation de la croissance des racines et l'augmentation de leur pourcentage; iii) un rendement accru en raison de l'amélioration de la germination et du taux d'enracinement; iv) l'augmentation du poids sec de la plante et du nombre de fleurs; v) un début de floraison plus précoce et un raccourcissement des périodes de culture.

Actuellement, les BCA représentent une part modeste du marché de la protection des plantes et ne comptent que très peu de substances et d'agents biologiques (Degenkolb *et al.*, 2015). Parmi les souches de *Trichoderma* sp. utilisées dans le domaine du biocontrôle on retrouve :

- *T. stromaticum* qui est un agent actif de la formulation commerciale Tricovab® servant pour lutter contre *Crinipellis perniciosus* (agent fongique de la « Maladie du balai de sorcière » sur cacaoyer),
- *T. atroviride* qui se trouve dans la formulation biofongicide Esquive® WP,
- *T. harzianum* qui est à la base de la formulation du produit commercial Trianum® (promoteur de croissance),

- D'autres souches récemment décrites : *Trichoderma afroharzianum*, *T. simmansii* et *T. guizhouense* utilisées dans des produits Vitalin®, Promot®WP et Trichomax® (Degenkolb *et al.*, 2015).

Peu d'études ont été réalisées dans le domaine du biocontrôle sur des champignons marins, mais elles suggèrent que l'écosystème marin puisse représenter une source significative de nouveaux BCA (Gal-Hemed *et al.*, 2011). En effet, cet environnement contient une biodiversité microbienne très riche, synthétisant des molécules avec des activités biologiques variées. De nombreux champignons isolés de différents habitats aquatiques marins se sont avérés être taxonomiquement proches des espèces présentes en environnement terrestre (Wang *et al.*, 2008; Paz *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010). En outre, bien que de nombreux champignons « marins » aient une origine terrestre, ils se sont parfaitement acclimatés à l'environnement marin.

Avec l'essor, ces dix dernières années, d'une politique d'agriculture durable et respectueuse de l'environnement, il est apparu intéressant de rechercher de nouveaux BCA et notamment parmi les micro-organismes d'origine marine.

1.3.1. Interactions avec les plantes

Un premier aspect intéressant pour l'utilisation des *Trichoderma* en lutte biologique est leur aptitude à interagir de manière positive avec les plantes.

❖ Colonisation des racines

Pendant la colonisation des racines, le *Trichoderma* se développe de manière intercellulaire. L'épiderme, le cortex et les vaisseaux de la plante restent intacts ou imperceptiblement changés. Une fois les hyphes du *Trichoderma* entrés dans les racines, le champignon s'installe dans l'espace intercellulaire de l'épiderme (Yedidia, 1999; Salas-Marina, 2011). La réussite de l'établissement de l'interaction plante/*Trichoderma* au stade précoce de la colonisation des racines pourrait impliquer l'activation de phénomènes de détoxification cellulaire et de mécanismes de protection. Durant la colonisation des racines, le *Trichoderma* est soumis au système de défense de la plante, qui synthétise des composés antimicrobiens tels que les phytoalexines. Les *Trichoderma* possèderaient donc des systèmes efficaces d'inhibition des

composés antimicrobiens de la plante (Ruocco, 2009; Masunaka, 2011). Plusieurs publications font état des effets bénéfiques des *Trichoderma* aussi bien sur les monocotylédones que sur les dicotylédones (au sens large) dus à la colonisation de leurs racines ou de la plante elle-même (Harman *et al.*, 2004; Shores *et al.*, 2010).

❖ Promotion de la croissance des plantes

La biofertilisation peut être définie comme l'utilisation des microorganismes du sol comprenant des bactéries et des champignons bénéfiques pour les plantes et pouvant vivre en association symbiotique avec elles pour améliorer leur nutrition et leur croissance de façon naturelle. Les champignons du genre *Trichoderma* sont les plus fréquemment utilisés dans le domaine du biocontrôle et les mieux étudiés quant à leurs mécanismes d'action. Par exemple, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. virens* et *T. viride* montrent une action biostimulante sur les récoltes horticoles (Figure 1-5) (Lopez-Bucio *et al.*, 2015).

Dans ce sens, plusieurs espèces de *Trichoderma* sont considérées comme des biofertilisateurs du fait de leur capacité à coloniser les racines des plantes permettant une meilleure nutrition, une croissance facilitée et un meilleur développement. Cette colonisation permet également une amélioration de la résistance de la plante au stress abiotique (Figure 1-5) (Lopez-Bucio *et al.*, 2015). La stimulation de la croissance des plantes par les *Trichoderma* est réalisée grâce à la production de phytohormones (auxines) et de certains autres métabolites secondaires, décrits de manière non exhaustive ultérieurement (Figure 1-5) (Lorito *et al.*, 2010).

L'hypothèse d'une stimulation de la croissance des plantes par les *Trichoderma* grâce à la solubilisation des nutriments disponibles dans l'environnement a été également émise (Mastouri *et al.*, 2010; Shores *et al.*, 2010). En effet, les *Trichoderma* colonisent les racines des plantes à l'intérieur et à l'extérieur induisant chez elles un mécanisme de défense. Ils augmentent également la capacité photosynthétique de la plante en échange d'une partie du sucrose produit par cette dernière (Vargas *et al.*, 2011). Ainsi, l'application de *T. virens* augmenterait la fixation du CO₂ photosynthétique dans les feuilles de plants de maïs (Vargas *et al.*, 2009).

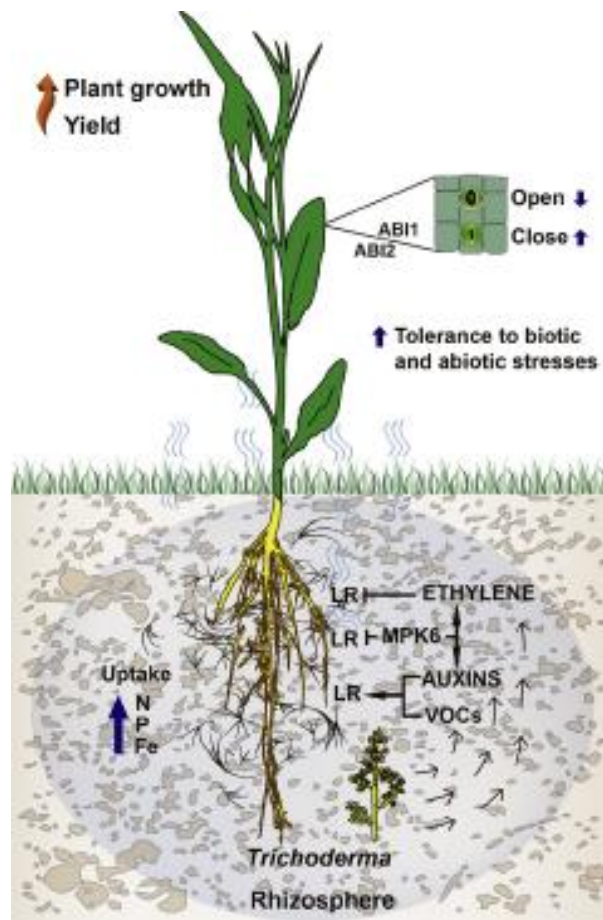


Figure 1-5 : Propriétés biostimulantes des *Trichoderma*, d'après Lopez-Bucio *et al.*, 2015 (Lopez-Bucio *et al.*, 2015)

La capacité des *Trichoderma* à promouvoir de façon directe la croissance des plantes a été évaluée sur des cultures de radis, de tomates et de tabac (Baker, 1984; Windham, 1986). Lors de ces études, une augmentation de la croissance des plantes a été observée lorsque le sol était supplémenté avec des conidies de *T. harzianum* et *T. koningii*. En effet, une étude menée par Benitez *et al.* (2004) a également mis en évidence que la co-culture de graines de tomate séparées d'un *Trichoderma* par une membrane de cellophane permettait de promouvoir la germination des graines (Benitez *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que les *Trichoderma* produisent et sécrètent des promoteurs de croissance et des facteurs de germination. De plus, Vinale *et al.* ont décrit en 2008 que l'harizionalide et la 6-pentyl- α -pyrone (6-PP), les 2

métabolites principaux produits par *T. atroviride* et *T. harzianum*, provoquaient un effet « auxin-like », c'est-à-dire une stimulation de la croissance de la plante, sur des semis de pois étiolés (*Pisum sativum*), de tomate (*Lycopersicum esculentum*) et de colza (*Brassica napus*) (Vinale *et al.*, 2008).

Par ailleurs, Rudresh *et al.* (2005) ont rapporté que l'utilisation d'un mélange de trois espèces de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* et *T. virens*) accroît la taille de la plante et la biomasse totale, améliore l'enracinement mais favorise également l'assimilation de phosphore (P) et d'azote (N) chez les plants de pois chiche (Rudresh *et al.*, 2005). Le phosphore est un élément indispensable à la croissance des plantes et peut se retrouver sous la forme insoluble de phosphate tricalcique dans les sols alcalins et sous forme de phosphate d'aluminium et de phosphate de fer dans les sols acides. Les *Trichoderma* produisent et sécrètent des acides organiques tels que l'acide gluconique, l'acide citrique ou l'acide fumarique capables de solubiliser le phosphore présent dans le sol (Gómez-Alarcón, 1994) (Azarmi, 2011). Plus récemment, Saravanakumar *et al.* (2013) ont confirmé la capacité des *Trichoderma* à solubiliser le phosphore présent dans le sol sous la forme insoluble de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, favorisant ainsi le développement de la mangrove (Saravanakumar *et al.*, 2013).

Les *Trichoderma* peuvent également participer à la solubilisation d'autres nutriments. En effet, l'application de *T. harzianum* sur des semis de tomate ou de concombre augmenterait la concentration dans les racines et dans les pousses des plantes des éléments cuivre (Cu), fer (Fe), zinc (Zn), manganèse (Mn), calcium (Ca), magnésium (Mg), phosphore (P), sodium (Na) et potassium (K) dans les racines et dans les pousses des plantes (Yedidia, 2001; Azarmi, 2011).

❖ Induction d'une résistance systémique et élicitation des défenses chez les plantes

Dans leur environnement naturel, les plantes peuvent être entourées par des micro-organismes bénéfiques ou délétères. Elles ont alors développé un système leur permettant de reconnaître ces micro-organismes et d'adapter leur réponse en fonction (parasitisme, mutualisme, symbiose) (Pozo, 2005). Pour lutter contre un pathogène, les plantes activent une multitude de défenses biochimiques et moléculaires. Les réponses des plantes à l'attaque d'un micro-organisme incluent la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), la mort cellulaire programmée pendant la réponse hypersensible (HR), la synthèse de métabolites secondaires à

activité antimicrobienne (phytoalexines), l'épaississement de la paroi cellulaire par la déposition de lignine et l'activation de protéines liées à la pathogénèse (PR). Le déclenchement de la résistance systémique des plantes n'est pas exclusivement dû aux pathogènes. Des micro-organismes non pathogènes peuvent également induire une résistance systémique dans certains cas (Monfil and Casas-Flores, 2014).

En plus de leur capacité à attaquer et inhiber la croissance des phytopathogènes, plusieurs rapports ont montré l'induction de résistances locales et systémiques chez les plantes par les *Trichoderma*. Ceci permet de limiter le développement d'une vaste gamme de phytopathogènes (Harman *et al.*, 2004; Shores *et al.*, 2010). Pour exemple, l'application de peptaïbols de synthèse à 18 résidus sur des plants de concombre induit également une résistance systémique contre *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, traduite par la synthèse de composés phénoliques antimicrobiens et la surexpression de gènes impliqués dans la synthèse de phytoalexines (Viterbo *et al.*, 2007).

Pour les *Trichoderma*, trois sortes de molécules élicitrices (stimulant les mécanismes de défense chez la plante) ont été proposées : (1) les oligosaccharides; (2) les composés de bas poids moléculaires; et (3) les protéines à activité enzymatique ou autre (Harman *et al.*, 2004). Les composés de bas poids moléculaires sont produits pendant l'interaction *Trichoderma*/hôte, par les racines des plantes ou par les phytopathogènes (Harman *et al.*, 2004). Les métabolites secondaires tels que l'harzionalide et le 6-PP produits par *T. harzianum* et *T. atroviride* ont été rapportés comme induisant la réponse de défenses systémiques chez des plants de tomate et des jeunes plants de colza contre *Botrytis cinerea* et *Leptosphaeria maculans*, respectivement (Vinale *et al.*, 2008). Le mécanisme biochimique régissant l'activité antivirale des *Trichoderma* sur les plantes est en grande partie inconnu. L'application de basses concentrations de peptaïbols antimicrobiens (trichokonines) isolés de *T. pseudokoningii* SMF2 sur les plants de tabac a induit une réponse de défense et la résistance systémique contre le virus de la mosaïque de tabac (TMV) (Luo *et al.*, 2010). L'application d'un mélange de peptides homologues de l'alaméthicine (peptaïbol à 20 résidus), produit par *T. viride* sur le haricot de Lima (*Phaseolus lunatus*) et sur le modèle biologique très étudié *Arabidopsis thaliana* a induit des réponses de

défense, comprenant la biosynthèse de composés organiques volatils (VOC) et la biosynthèse d'acide salicylique (Engelberth, 2001; Chen *et al.*, 2003).

1.3.2. Interaction directe avec les pathogènes

Comme dit précédemment, les *Trichoderma* peuvent être utilisés comme promoteurs de croissance, mais ils peuvent également attaquer directement les pathogènes responsables de maladies dévastatrices pour les cultures (Monfil and Casas-Flores, 2014).

1.3.2.1. Mycoparasitisme et métabolites secondaires

Une interaction antagoniste établie entre 2 espèces fongiques pour laquelle l'une attaque directement l'autre est appelée mycoparasitisme. Les relations antagonistes de mycoparasitisme peuvent être séparées en 2 sous-groupes :

- les interactions biotrophiques : le champignon pathogène colonise et se nourrit de son hôte sans induire sa mort. Ces champignons sont considérés comme étant de mauvais candidats à une utilisation en biocontrôle car ils ne tuent pas leur hôte.
- les interactions nécrotrophiques : le champignon touche une grande variété d'hôtes et est beaucoup plus agressif envers eux, entraînant leur mort. Ces champignons sont considérés comme de bons candidats pour une utilisation en biocontrôle, du fait de leur action fongicide sur un grand nombre de phytopathogènes.

Les champignons du genre *Trichoderma/Hypocrea* font partie de cette dernière catégorie. Le mécanisme employé par les *Trichoderma* est un processus complexe qui implique différents événements. Tout d'abord, une croissance chimiotrophe positive vers l'hôte (champignon pathogène) est observée, suivie par le contact direct puis l'enroulement autour des hyphes de l'hôte. De plus, des changements morphologiques interviennent dans les hyphes des *Trichoderma* par formation d'une structure de pénétration semblable à un appressorium (différentiation cellulaire des hyphes en structures mélanisées permettant la pénétration dans le tissu hôte) et par la production d'enzymes de dégradation des parois cellulaires (CWDEs, de l'anglais « *cell-wall degrading enzymes* »). Ces dernières permettent au *Trichoderma* de pénétrer l'hyphe du champignon hôte induisant sa mort, ce qui conduit ensuite à l'absorption

des nutriments des tissus morts par le *Trichoderma*, en quasi saprophytisme (Reithner *et al.*, 2005; Monfil and Casas-Flores, 2014).

❖ Production d'enzymes

La production d'enzymes de dégradation des parois cellulaires est un point clé dans l'établissement d'une relation de mycoparasitisme. En effet, la paroi cellulaire fongique est la première barrière entre le champignon proie et le mycoparasite. Les enzymes impliquées dans la dégradation des membranes cellulaires de l'hôte incluent des chitinases, des glucanases, des N-acetylglucosanimidases et des protéases. Des études ont pointé l'implication d'une activité hydrolytique dans le comportement saprotrophe des *Trichoderma* (Mach *et al.*, 1999; Olmedo-Monfil *et al.*, 2002). Ceci signifie que les différentes espèces de microorganismes sont en compétition pour les ressources nutritives, les poussant à utiliser leur arsenal chimique pour acquérir la plus grande quantité de nutriments. Le premier sécrétome (ensemble des protéines sécrétées) publié a été obtenu lors d'une culture en confrontation entre un *Rhizoctonia solani* et un *T. harzianum*. Il a permis de mettre en évidence une activité enzymatique augmentée (CWDEs, chitinase, cellulase, xylanases...) du *Trichoderma* en présence du *R. solani* (Tseng *et al.*, 2008).

❖ Production de métabolites secondaires

Dans des conditions spécifiques, les métabolites secondaires jouent un rôle important dans le signalement, le développement et l'interaction avec d'autres organismes, justifiant ainsi l'importance de leur étude dans le contexte du biocontrôle.

La mise en évidence de la production de métabolites secondaires par les *Trichoderma* a été initiée par la découverte de leur production d'un antifongique par Weindling en 1934 (Papavizas, 1985). Depuis, de nombreux travaux ont montré une grande diversité de métabolites produits par les *Trichoderma* (Landreau, 2001; Schuster and Schmoll, 2010; Lopes *et al.*, 2012). Par exemple, il a été répertorié plus de 100 métabolites produits par des espèces du genre *Trichoderma* ayant des actions antibiotiques. Parmi ces métabolites, sont retrouvés des peptides non ribosomiaux, des polycétides, des terpènes mais également des mycotoxines

(Sivasithamparam, 1998) (Landreau, 2001; Sandgren *et al.*, 2005) qui sont exploités dans divers domaines biotechnologiques (Kubicek *et al.*, 2003).

Les *Trichoderma* produisent aussi des sidérophores (peptides capables de chélater le fer) ainsi qu'un grand nombre de peptaïbiotiques dont font partie les peptaïbols, petits peptides linéaires à synthèse non ribosomales riches en acides aminés non protéinogènes (qui feront l'objet du chapitre suivant) (Degenkolb *et al.*, 2006)

De nombreux métabolites volatiles ont également été mis en évidence tels que des alcools, des cétones, des alcanes, des furanes et des mono- et sesquiterpènes (Lorito *et al.*, 1996; Cortes *et al.*, 1998; Steyaert *et al.*, 2004; Suarez *et al.*, 2004; Reithner *et al.*, 2005). Lors de cultures en confrontation d'un *Trichoderma* sp. et d'un *Fusarium* sp. une inhibition de la production des composés organiques volatiles chez *Trichoderma* a été observée. La production d'acide fusarique par *Fusarium* sp. en serait la cause (Stoppacher *et al.*, 2010).

Reithner *et al.* (2005) ont montré le rôle du gène *Tga1* codant la sous unité G α dans la production des métabolites secondaires. De plus, l'absence de ce gène induirait un arrêt de la prolifération mycoparasitique du *Trichoderma*, le rendant ainsi inefficace à combattre les pathogènes (Reithner *et al.*, 2005).

Certaines espèces de *Trichoderma* produisent des métabolites secondaires néfastes du point de vue d'une application en biocontrôle : les mycotoxines. Parmi elles, les trichotécènes sont les plus connues. Les trichotécènes sont des mycotoxines appartenant au groupe des sesquiterpenoïdes qui sont produits par les champignons appartenant à l'ordre des Hypocréales. Leur structure varie par l'oxygénation ou l'estérification de leur cœur tricyclique comportant une fonction époxyde (Malmierca *et al.*, 2012). *T. brevicompactum*, *T. arundinaceum* et *T. virens* ont été identifiés comme étant producteurs de ce groupe de mycotoxines (Degenkolb *et al.*, 2008).

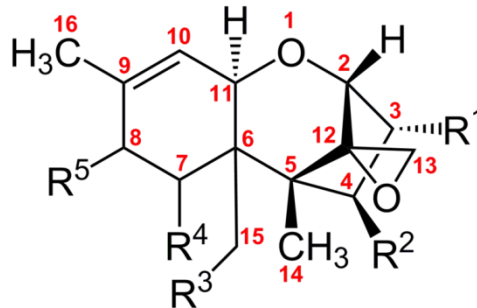


Figure 1-6 : Structure générale des trichotécènes.

D'autres mycotoxines ont été repérées chez les *Trichoderma* comme des peptides cycliques, gliotoxine, isocyanides, toxine T-2, harzianum A et trichodermine. Néanmoins, les espèces de *Trichoderma* actuellement utilisées en biocontrôle ne sont pas connues pour produire des mycotoxines (Degenkolb *et al.*, 2015).

Il semble néanmoins que si les mécanismes précédemment décrits (mycoparasitisme et production de métabolites secondaires), impliqués dans la capacité des *Trichoderma* à neutraliser les pathogènes étaient activés de manière indépendante, les activités antagonistes de ces champignons seraient limitées ainsi que leur utilisation comme BCA (Monfil and Casas-Flores, 2014). Des études montrent en effet une coopération entre les enzymes lytiques et les antibiotiques permettant d'augmenter les caractéristiques de BCA des *Trichoderma* (Schirmbock *et al.*, 1994 ; Saravanakumar *et al.*, 2016). Les enzymes lytiques permettraient de dégrader les parois cellulaires, les rendant plus fragiles et plus perméables à l'attaque des antibiotiques (Lorito *et al.*, 1996).

1.3.2.2. Compétition pour les nutriments

Un autre aspect de la capacité antagoniste des *Trichoderma* réside dans le fait qu'ils sont d'excellents compétiteurs pour l'espace et pour les nutriments. De ce fait, la plupart des souches de *Trichoderma* pouvant capter plus de nutriments se développeront plus rapidement que les autres champignons de leur environnement et auront un avantage certain dans la colonisation des niches écologiques. Par exemple, le fer est naturellement présent sous forme insoluble dans le sol mais les *Trichoderma* possèdent des sidérophores pour l'assimiler et le chélater (Segarra *et al.*, 2010). Ces sidérophores sont des peptides qui vont servir de ligand et de

transporteurs pour le fer sous forme Fe^{3+} (Altomare *et al.*, 1999) et vont participer à la protection des cellules contre le stress oxydatif chez *Aspergillus fumigatus* (Wallner, 2009). La compétition pour le fer est également un mécanisme mis en cause dans la capacité des *Trichoderma* à limiter le développement des champignons du genre *Fusarium* (Segarra *et al.*, 2010).

2. Les peptaïbols

2.1. Définition et classification

Les peptaïbols sont des petits peptides linéaires à synthèse non ribosomale dont la masse est comprise entre 500 et 2200 Da. Ils sont produits par divers champignons filamenteux tels que ceux appartenant aux genres *Sepedonium*, *Gliocladium*, *Stilbella*, *Emericellopsis*, *Acremonium* ou *Trichoderma/Hypocrea*. Le terme peptaïbol a été proposé par Benedetti *et al.* en 1982 (Benedetti *et al.*, 1982) et Brückner et Graf en 1983 (Brückner *et al.*, 1983) pour définir les peptides linéaires à activité antibiotique ayant pour caractéristique une forte proportion d'acides aminés non protéinogènes tel que l'acide α -aminoisobutyrique (Aib, U) ou l'isovaline (Iva, J), un acide aminé N-terminal acétylé et un acide aminé réduit en amino-alcool en position C-terminale. Brückner *et al.* ont ensuite introduit (en 1991) le terme de peptaïbiotiques pour décrire des molécules présentant de nombreuses caractéristiques des peptaïbols mais pas toutes. Par exemple des peptides pour lesquels les résidus amino-alcool C-terminal n'étaient pas définis (Brückner *et al.*, 1991). Ces définitions ont été révisées par Degenkolb *et al.* (2003, 2007 et 2008) (Degenkolb *et al.*, 2003; Degenkolb *et al.*, 2007; Degenkolb *et al.*, 2008). Actuellement, plus de 1300 séquences de peptaïbiotiques sont connues et divisées en 6 groupes majoritaires :

- Les peptaïbols, définis précédemment ;
- Les lipopeptaïbols, peptaïbols dont l'extrémité N-terminale est acylée par un acide gras;
- Les lipoaminopeptides, peptides riches en Aib, possédant un ou plusieurs résidus lipoaminoacides ;
- Les peptaïbiotiques cycliques dont le premier et le dernier résidu sont liés pour former une chaîne peptidique cyclique ;

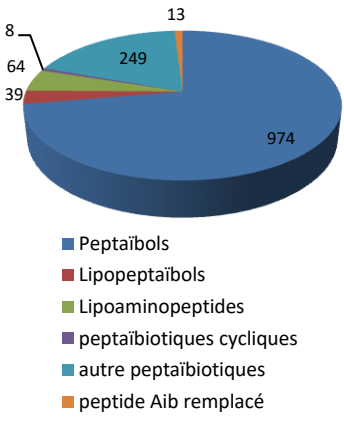
- Les autres peptaïbiotiques, non classables dans les 4 précédents groupes.
- Des peptaïbols courts dans lesquels l'Aib est remplacé par un acide aminé standard

Le tableau 1-1 suivant regroupe les principales caractéristiques des peptaïbiotiques.

Les peptaïbols correspondent au sous-groupe majoritaire des peptaïbiotiques avec 974 séquences décrites (Degenkolb *et al.*, 2003). Leurs séquences sont regroupées dans la base de données « Peptaibiotics Database » accessible en ligne (<https://peptaibiotics-database.boku.ac.at>) (Stoppacher *et al.*, 2013; Neumann *et al.*, 2015).

Plusieurs classifications ont été proposées, la principale étant celle décrite par Chugh et Wallace (2001) en 9 sous-familles de peptaïbols et peptaïbiotiques (SF-1 à -9) (Chugh and Wallace, 2001). Cette classification est basée sur l'enchaînement et le nombre d'acides aminés, ainsi que sur leurs résidus C-terminal. Toutefois, il est également possible de classer les peptaibols suivant leur longueur de chaîne en peptaïbols courts ou longs (Degenkolb and Brückner, 2008) ou selon leur nombre de résidus en peptaïbols à 11, 14, 18, 19 ou 20 résidus, par exemple (Tableau 1-1).

Tableau 1-1 : Les différents sous-groupes de peptaïbiotiques et leurs caractéristiques

	Caractéristiques structurales			Proportion des séquences décrites
	N-terminal	C-terminal	Résidus particuliers	
Peptaïbols	Acétylé	amino-alcool libre	Aib, Iva, Hyp	
Lipopeptaïbols	acide gras	amino-alcool libre	Aib, Iva, EtNor	
Lipoaminopeptides	acide gras α -méthylé	amino-alcool substitué, amine, amide, aminé	Aib, Iva, MePro, Hyleu, acides lipoaminés	
Peptaïbiotiques cycliques	Cycle		Aib, Iva, Pip, D-Ome-Tyr, D-Pro	
Autres peptaïbiotiques	Acétylé	amino-alcool substitué, amine, amide, acide miné, piperazine-dione, sucre-alcool	Aib, Iva, Hyp, Pip	
Peptide avec Aib remplacé	Acétylé	amino-alcool	Aib remplacé par un acide aminé standard	

2.2. Biosynthèse des peptaïbols

La présence d'acides aminés non protéinogènes dans les séquences des peptaïbols a très vite contribué à l'hypothèse d'une synthèse non ribosomale impliquant des complexes multienzymatiques, les peptides synthétases ou NRPS (*Non Ribosomal Peptide Synthetase*), comme c'est le cas pour d'autres peptides microbiens antibiotiques tels que la ciclosporine (Billich and Zocher, 1987) ou la gramicidine (Kurahashi *et al.*, 1982). Cette voie de biosynthèse est à l'origine de la grande diversité de séquences et de la production des peptaïbols en mélanges microhétérogènes comportant un ou plusieurs composés majoritaires (Brückner and Przybylski, 1984). Les peptides synthétases sont organisés sous forme de modules, sous-unités semi-autonomes, chacun de ces modules permettant l'incorporation ou la modification d'un acide aminé spécifique. Chaque module reconnaît, active et modifie un résidu du peptide final (Marahiel *et al.*, 1997). Ces modules sont eux-mêmes divisés en plusieurs domaines ayant

chacun un rôle différent dans l'incorporation de l'acide aminé. Trois domaines principaux peuvent alors être décrits :

- le domaine d'adénylation (A) : par une réaction d'adénylation (transformation de l'acide aminé en aminoacyl adénylate), ce module permet la reconnaissance spécifique des acides aminés adénylés,
- le domaine de thiolation (T ou PCP, Peptidyl Carrier Protein) : par l'intermédiaire d'une liaison thioester, il permet de fixer de manière covalente l'acide aminé à la peptide synthétase,
- le domaine de condensation (C) : il permet la formation d'une liaison peptidique entre deux résidus.

Il est communément admis que le nombre de résidus du peptaïbol produit dépend du nombre de modules présents dans la peptide synthétase (Kleinkauf and Von Döhren, 1990). Les modules des extrémités comportent des enzymes spécifiques permettant l'acétylation du résidu N-terminal et la réduction en amino-alcool du résidu en position C-terminale (Marahiel *et al.*, 1997; Reiber *et al.*, 2003). De plus, la réaction d'élongation des peptaïbols est catalysée par un cofacteur d'enzyme, la 4-Phosphopantéthéine (Daniel and Rodrigues Filho, 2007).

Plusieurs études ont permis la mise en évidence et la caractérisation des peptides synthétases impliquées dans la biosynthèse des peptaïbols. En 2002, Wiest *et al.* (2002) ont réussi à séquencer et cloner le gène nommé *Tex1* codant une peptide synthétase chez un *T. virens* qui produit un mélange complexe de peptaïbols à 11, 14 et 18 résidus (Wiest *et al.*, 2002). L'étude a révélé que le gène *Tex1* encodait une peptide synthétase composée de 18 modules responsables de la synthèse de tous les peptaïbols de la souche étudiée. En effet, des mutations réalisées sur le gène *Tex1* au niveau du module 11 ont entraîné une inhibition de la production de tous les peptaïbols. Reiber *et al.* (2003) sont arrivés à des conclusions différentes lors de l'étude de deux protéines impliquées dans la synthèse de l'ampullosporine (peptaïbol à 15 résidus), réfutant l'hypothèse émise par Wiest *et al.* en 2002. Selon eux, les peptaïbols à moins ou à plus de 15 résidus ne peuvent pas être synthétisés par la même synthétase que l'ampullosporine et ses analogues, du fait d'un manque de spécificité de certains modules vis-à-

vis de l'acide aminé à incorporer. Il existerait donc plusieurs NRPS responsables chacune de la synthèse d'un groupe différent de peptaïbols. L'étude de Wei *et al.* réalisée en 2005 sur une souche de *T. virens* ayant le même profil de peptaïbols que celle utilisée par Wiest *et al.* en 2002 va dans le même sens que l'étude de Reiber *et al.*. En effet, la mutation réalisée sur un gène homologue de *Tex1* interrompait uniquement la production des peptaïbols à 18 résidus (Wei *et al.*, 2005). Les auteurs proposent l'hypothèse de l'existence de deux gènes différents, l'un codant la NRPS responsable de la synthèse des peptaïbols à 18 résidus et l'autre codant celle qui est responsable de la biosynthèse de peptaïbols courts (11- et 14-résidus). En 2012 les travaux de Mukherjee *et al.* puis de Degenkolb *et al.* ont confirmé cette hypothèse. L'étude de trois souches de *Trichoderma* d'espèces différentes, dont l'une est la souche utilisée par Wiest *et al.* en 2002, a montré que les peptaïbols à 11 résidus étaient produits par la même NRPS que celle biosynthétisant les peptaïbols à 14 résidus. L'absence de ces trois acides aminés serait dû à une boucle réalisée par la NRPS responsable du saut des modules 4 à 7 (Figure 1-7) (Degenkolb *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2012).

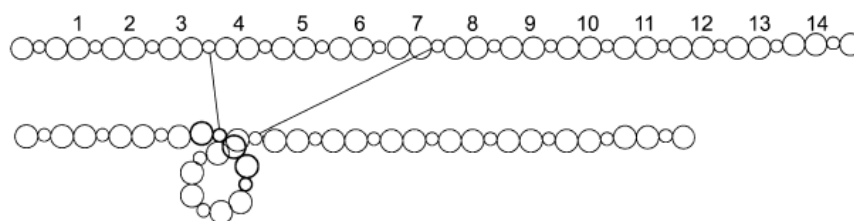


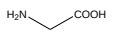
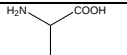
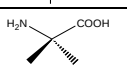
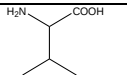
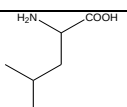
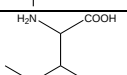
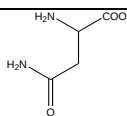
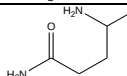
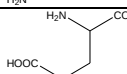
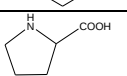
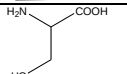
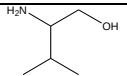
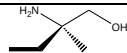
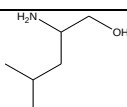
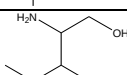
Figure 1-7 : Synthèse des peptaïbols à 11 résidus par le mécanisme de "Module skipping" au sein de la NRPS synthétisant les peptaïbols à 14 résidus (Degenkolb *et al.*, 2012).

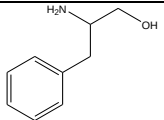
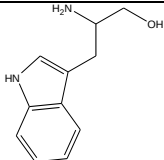
2.3. Structures des peptaïbols

2.3.1. Structure primaire

Les peptaïbols sont constitués d'un enchainement d'acides aminés liés entre eux par des liaisons amines dites peptidiques. Treize des acides aminés codés par le code génétique et trois non codés entrent dans la composition de la chaîne peptidique (Tableau 1-2).

Tableau 1-2 : Acides aminés et amino-alcools présents dans les peptaïbols de *Trichoderma*

Nom	Abréviation		Structure	Masse moléculaire du résidu (Da)	Protéinogène
	Code à 3 lettres	1 lettre			
Acides aminés					
Glycine	Gly	G		57	Oui
Alanine	Ala	A		71	Oui
Acide α-amino-isobutyrique	Aib	U		85	Non
Valine	Val	V		99	Oui
Isovaline	Iva	J		99	Non
Indéterminé Valine ou Isovaline	Vxx	Vx		99	
Leucine	Leu	L		113	Oui
Isoleucine	Ile	I		113	Oui
Indéterminé Leucine ou Isoleucine	Lxx	Lx		113	
Asparagine	Asn	N		114	Oui
Glutamine	Gln	Q		128	Oui
Acide glutamique	Glu	E		129	Oui
Proline	Pro	P		97	Oui
Sérine	Ser	S		87	Oui
Amino-alcools provenant de la réduction des acides aminés précédents					
Valinol	Valol	Vol		102	*
Isovalinol	Ivaol	Jol		102	*
Indéterminé Valinol/Isovalinol	Vxxol	Vxol		102	
Leucinol	Leuol	Lol		116	*
Isoleucinol	Ileol	Iol		116	*

Indéterminé Leucinol/Isoleucinol	Lxxol	Lxol		116	
Phénylalaninol	Pheol	Fol		150	*
Tryptophanol	Trpol	Wol		190	*

Ils sont pour la plupart de configuration L, sauf l'acide α -amino-isobutyrique (Aib) et la glycine (Gly), qui ne possèdent pas de carbones asymétriques et l'isovaline (Iva) qui peut être observée sous forme D. Chez les *Trichoderma* on ne rencontre pas d'hydroxyproline (Hyp, O) mais seulement de la proline.

Les peptaïbols peuvent être classés suivant leur longueur de chaîne peptidique en plusieurs groupes. Ainsi, chez les *Trichoderma*, les plus communs sont ceux à 11, 14, 18, 19 et 20 résidus. (Rebuffat *et al.*, 2000; Whitmore and Wallace, 2004; Degenkolb and Brückner, 2008). Les peptaïbols les plus courts (11 à 14 résidus) contiennent souvent une forte proportion de proline dans leur séquence (2 à 3 résidus). Le résidu C-terminal amino-alcool est souvent un leucinol ou un valinol. Les peptaïbols à 11 résidus sont les composés majoritaires de ce groupe avec 293 séquences décrites (Neumann *et al.*, 2015). Pour exemple, la bergofongine D, les trilongines et les suzukacillines font partie de ce groupe (Berg *et al.*, 1996; Mikkola *et al.*, 2012; Rohrich *et al.*, 2013).

Les peptaïbols les plus longs sont composés généralement 18 à 20 résidus avec une proline en position centrale et des glutamines proches des extrémités. Le résidu C-terminal peut être un phénylalaninol, un tryptophanol, un leucinol, un isoleucinol, un valinol ou un isovalinol. Leurs masses molaires sont comprises entre 1675 et 2006 Da et ils représentent 52% des séquences de peptaïbols décrites jusqu'ici. Les composés les plus étudiés de ce groupe sont les alaméthicines (peptaïbols à 20 résidus) et dont certaines sont disponibles commercialement

(Kirschbaum *et al.*, 2003; Psurek *et al.*, 2006). Le graphique en Figure 1-8 montre la répartition des séquences décrites pour les différentes longueurs de peptaïbols.

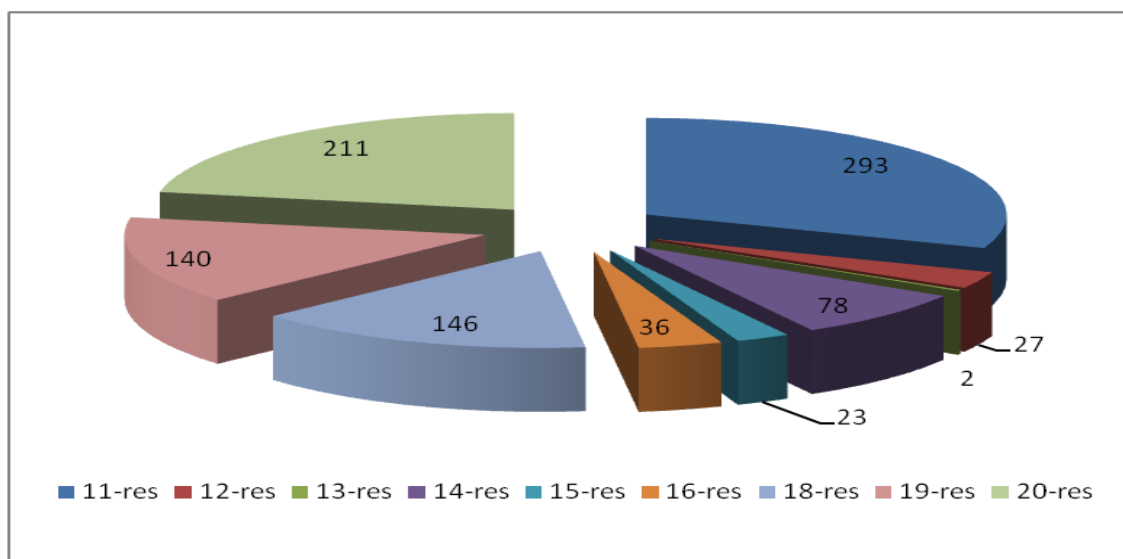


Figure 1-8 : Répartition des principaux sous-groupes de peptaïbols, toutes espèces fongiques productrices confondues.(d'après la « peptaibiotics database »).

Il existe également des peptaïbols moins représentés en terme de nombre de séquences, comme les peptaïbols de 5 à 10 résidus (non présentés ici) (Degenkolb and Brückner, 2008). Seulement 38 séquences sont décrites à ce jour (Neumann *et al.*, 2015). Leur résidu C-terminal est le plus souvent un prolinol et ils ne contiennent pas de résidu proline dans leur séquence. La peptaïbotine et les Asperellines font partie de ce groupe (d'après la « *Peptaibiotics Database* »).

2.3.2. Structure secondaire

La structure secondaire des peptaïbols a été étudiée par différentes techniques analytiques telles que la résonance magnétique nucléaire, le dichroïsme circulaire ou la diffraction des rayons X et par des méthodes de modélisation moléculaire (Rebuffat *et al.*, 1999; Shenkarev *et al.*, 2013). Les résultats de ces études ont montré que la forte proportion en acide α -aminoisobutyrique dans les peptaïbols était responsable de leur conformation en hélice α , hélice 3_{10} ou un dérivé de cette dernière structure : le ruban de coude β . En effet, le résidu Aib favorise la structure en hélice du fait des contraintes stériques imposées par les deux groupements méthyle sur l'atome C α de cet acide aminé (Chugh and Wallace, 2001).

L'hélice α est obtenue par rotation régulière de la chaîne peptidique principale stabilisée par des liaisons hydrogènes intramoléculaires entre l'atome d'oxygène du carbonyle d'un résidu n et le proton amide du résidu $n+4$ (Figure 1-9 et Figure 1-10).

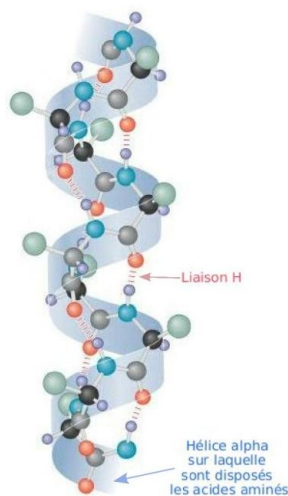


Figure 1-9 : Représentation d'une hélice α

L'hélice 3_{10} est également stabilisée par des liaisons hydrogènes mais entre l'atome d'oxygène du carbonyle d'un résidu n et le proton de l'amide du résidu $n+3$ (Di Blasio *et al.*, 1992) (Figure 1-10).

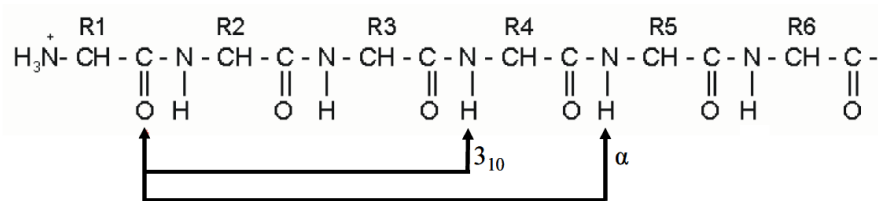


Figure 1-10 : Hélice 3_{10} et α caractérisée par des liaisons hydrogènes (Poirier, 2007)

La présence de proline, quant à elle, introduit des « cassures » dans cette conformation hélicoïdale (cf. Figure 4-5 du chapitre 4). La conformation en ruban de coude β est alors observée pour des peptides constitués d'une alternance régulière des motifs Aib-Pro ou Aib-Hyp (Figure 1-11). Ce modèle est stabilisé par des liaisons identiques à celles de l'hélice 3_{10} mais interrompues au niveau des résidus Pro ou Hyp (Di Blasio *et al.*, 1992).

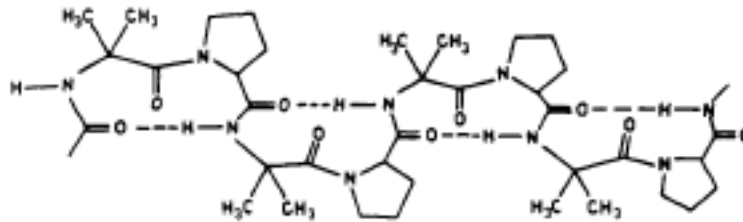


Figure 1-11 : Structure générale d'une conformation en ruban de coude β (Di Blasio *et al.*, 1992)

La taille du peptide, le nombre de résidus Aib et leur localisation influence la structure des peptaïbols. En effet, les peptides composés de moins de 8 acides aminés adoptent préférentiellement la structure hélice 3_{10} et les peptides de 9 à 20 résidus se structurent en hélice α (Szekeres *et al.*, 2005). En conformation hélicoïdale, les résidus vont placer leur chaîne latérale vers l'extérieur de l'hélice en formant un cylindre. Ce phénomène va induire le caractère amphiphile des peptaïbols : une face du cylindre sera hydrophile alors que l'autre sera hydrophobe (Sansom, 1993). De plus, la structure en hélice constitue un dipôle où les extrémités N- et C-terminales constituent respectivement les pôles positif et négatif. Le moment dipolaire ainsi induit va alors intervenir dans les mécanismes d'action membranaires (Oh *et al.*, 2000).

2.4. Propriétés membranaires des peptaïbols

Il est communément admis que les peptaïbols interagissent avec les membranes biologiques en modifiant leur perméabilité par la formation de canaux ioniques voltage-dépendants (El Hajji *et al.*, 1989; Sansom, 1993; Béven *et al.*, 1998; Huang, 2000). Cette modification de perméabilité s'accompagne d'une fuite extracellulaire d'ions (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , K^+) et de métabolites ainsi que de la dépolarisation de la membrane aboutissant, à terme, à la mort de la cellule (Cafiso, 1994; Chugh and Wallace, 2001).

2.4.1. Formation des canaux transmembranaires

Plusieurs modèles de formation des canaux ioniques ont été proposés pour expliquer l'insertion des peptides dans les membranes biologiques. Ces études ont principalement été réalisées sur l'alaméthicine et tiennent compte uniquement des caractéristiques structurales de ces

peptaïbols. Deux modèles principaux sont couramment décrits (modèle « en douve de tonneau » (Figure 1-12) et « en tapis » (Figure 1-13)), et l'hypothèse d'un autre modèle de formation des canaux ioniques transmembranaires (modèle « torique » (Figure 1-14)) a été soulevée pour la première fois par Matsuzaki *et al.* en 1996 (Matsuzaki *et al.*, 1996) puis observé pour les peptaïbols par Christoffersen *et al.* en 2015 (Christoffersen *et al.*, 2015).

Le modèle « en douve de tonneau », décrit pour la première fois indépendamment par Baumann/Muller et Boheim en 1974, est celui qui régit l'insertion de l'alaméthicine et de ses analogues à longues séquences dans les membranes biologiques (Baumann and Mueller, 1974; Boheim, 1974; Shenkarev *et al.*, 2013). Ce modèle suggère que les canaux sont formés de plusieurs monomères qui s'assemblent comme les planches d'un tonneau, liés entre eux par l'interaction de certains acides aminés. En tournant leur parties hydrophiles vers l'intérieur du canal et leur parties hydrophobes au contact des acides gras de la bicouche lipidique ; ils forment alors le pore (Chen, 2002). L'ensemble est stabilisé par des interactions peptide-peptide, peptide-lipide et peptide-eau (Sansom, 1993; Epand *et al.*, 1995) (Figure 1-12).

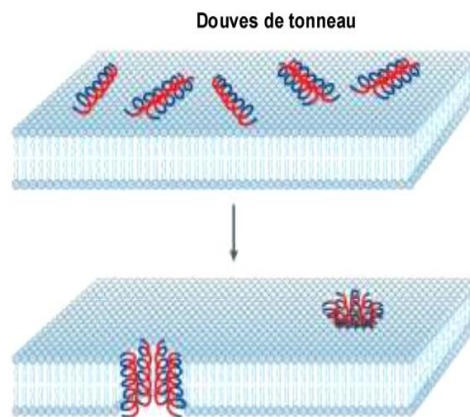


Figure 1-12 : Modélisation de la formation des canaux transmembranaires par les mécanismes "en douves de tonneau", d'après Brogden, 2005 (Brogden, 2005)

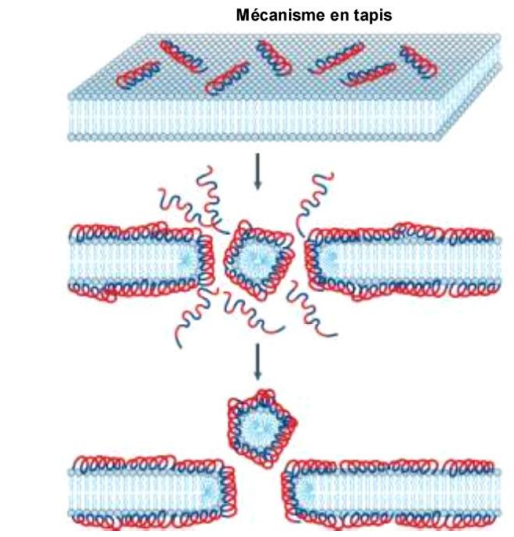


Figure 1-13 : Modélisation de la formation des canaux transmembranaires par les mécanismes "en tapis", d'après Brogden, 2005 (Brogden, 2005)

Le modèle « en tapis » est souvent décrit comme un modèle de type détergent reposant sur l'accumulation d'un grand nombre de peptides à la surface de la membrane (Pouny *et al.*, 1992; Epand *et al.*, 1995). En effet, les peptides vont être attirés par des forces électrostatiques vers la tête anionique des phospholipides et vont former un tapis en positionnant leurs parties hydrophobes au contact de la membrane. Cette accumulation va désorganiser la membrane et finir par entraîner sa rupture en formant des micelles (Chugh and Wallace, 2001). Ce modèle est largement décrit pour l'insertion des peptaïbols courts dans la membrane (Figure 1-13).

Un troisième modèle, décrit pour la première fois dans le cas du peptide antibiotique magainine (qui n'est pas un peptaïbol), est le modèle de « pores toriques » (Matsuzaki *et al.*, 1996) (Figure 1-14). Ce modèle diffère du modèle « en douve de tonneau » dans lequel les peptides sont toujours associés aux têtes polaires des lipides même lorsqu'ils sont perpendiculairement insérés dans la bicouche lipidique. Dans la formation de tels pores, la monocouche lipidique se plie de manière continue du sommet au bas en formant un trou torique, pour que le pore soit aligné aussi bien avec les peptides qu'avec les têtes polaires des lipides (Yang *et al.*, 2001).

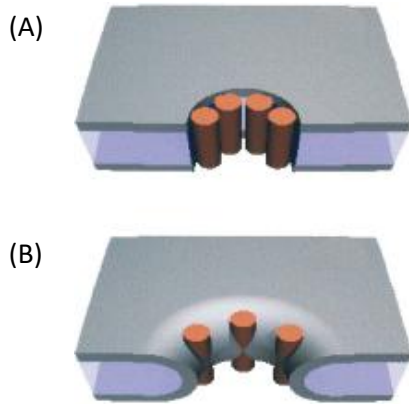


Figure 1-14 : Comparaison schématique du modèle en douve de tonneau (A) et du modèle de pores toriques (B), d'après Yang et al., 2001 (Yang *et al.*, 2001)

De nombreux travaux s'accordent dans la description de la formation des canaux transmembranaires en plusieurs étapes (Huang, 2000; vitkova, 2006; Oliynyk, 2007). En effet, à faible concentration peptidique par rapport aux lipides de la bicouche phospholipidique des membranes biologiques, les peptides vont s'adsorber parallèlement à la surface de la membrane. Lorsque le ratio peptide/lipide augmente, un changement de conformation des monomères peptidiques permet l'insertion de leur domaine hydrophobe (extrémité N-terminale) dans la membrane en repoussant les têtes hydrophiles des phospholipides (He, 1996). Enfin, au-dessus d'un certain ratio peptide/lipide, les monomères se regroupent dans la membrane, formant ainsi des pores. L'importance du voltage transmembranaire dans l'initiation de l'insertion de peptaïbols dans les membranes biologiques a été mise en évidence par des études sur des membranes artificielles (Duclohier and Wroblewski, 2001). Cette sensibilité au voltage est cependant dépendante du peptaïbol en jeu (Duclohier *et al.*, 2004).

2.4.2. Caractéristiques des canaux transmembranaires

Les caractéristiques des canaux transmembranaires dépendent de plusieurs facteurs tels que la séquence du peptide mais également de la composition en lipides, de la température ou du degré d'hydratation des membranes biologiques (Lucaciu *et al.*, 1997; Duclohier, 2004; Marsh *et al.*, 2007).

Les variations de taille des canaux transmembranaires dépendent du nombre de monomères insérés. En effet, les canaux formés par l'alaméthicine (peptaïbols à 20 résidus) ont un diamètre variant de 16 à 26 Å et comportent de 6 à 12 monomères (He, 1996). La forme octamérique serait la plus stable (Figure 1-15) (Fox and Richards, 1982; Chugh *et al.*, 2002).

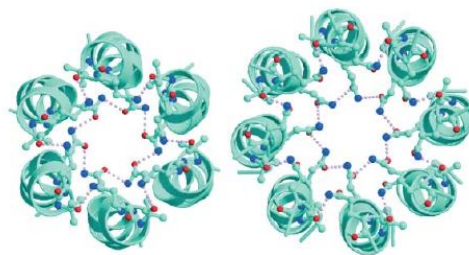


Figure 1-15 : Formation d'un canal hexamérique (gauche) et octamérique (droite), d'après Duclohier et al. en 2004 (Duclohier *et al.*, 2004)

En l'absence de données de conductance, un modèle octamérique a été créé pour la trichotoxine_A50E, peptaïbol à 18 résidus présentant une conformation entièrement en hélice α , en analogie avec l'alaméthicine (Chugh *et al.*, 2002). Mais, la trichotoxine_A50E adopterait naturellement la forme hexamérique (Figure 1-15) (Duclohier *et al.*, 2004). La conformation presque droite de la molécule permet la formation de canaux parallèles dont le diamètre ne varie pas. De plus, la formation des canaux semble moins voltage-dépendant dans le cas de la trichotoxine_A50E que dans celui de l'alaméthicine. Cette conformation est également observée dans le cas de peptaïbols courts tels que l'harzianine HC (peptaïbol à 14 résidus) (Lucaciu *et al.*, 1997) ou l'antiamoebine I (peptaïbol à 16 résidus) (O'Reilly, 2003).

Le nombre de monomères, et donc la taille des canaux, influent sur la conductance mais aussi sur la sélectivité ionique des canaux. Par exemple, les canaux ioniques formés par la trichotoxine_A50E présentent un transport ionique de cations (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+}) plus élevé que celui de l'alaméthicine. Ceci serait lié à des différences de potentiels électrostatiques à l'intérieur des canaux, dû aux moments dipolaires des monomères (Duclohier *et al.*, 2004). Dans le cas de l'antiamoebine I, le potentiel de surface à l'intérieur du canal serait négatif, favorisant alors le passage des cations (O'Reilly, 2003).

2.4.3. Relation structure/ formation des pores des peptaïbols

De manière générale, une conformation hélicoïdale, une forte affinité pour les lipides membranaires, une importante amphipathie et une capacité importante d'agrégation dans les membranes sont les critères nécessaires à la formation de canaux transmembranaires voltage-dépendant par les peptides (Kropacheva *et al.*, 2005).

Mais des critères structuraux influent également sur la propension du peptide à former des canaux transmembranaires. En effet, le nombre de résidus joue un rôle important. Les peptaïbols longs (18 à 20 résidus) sont plus efficaces que les peptaïbols plus courts (11 à 17 résidus) (Grigoriev *et al.*, 2003). La concentration des harzianines HC (peptaïbols à 14 résidus) nécessaire à une activité membranaire effective est dix fois plus élevée que celle nécessaire dans le cas de leurs homologues à 18 résidus (Rebuffat *et al.*, 1999). Très peu de données sont disponibles sur l'activité membranaire des peptaïbols de 15 à 17 résidus.

La nature des résidus constituant la chaîne peptidique a également de l'importance. La présence de résidus hydrophobes favorise l'activité membranaire notamment chez les peptaïbols courts (Rebuffat *et al.*, 2000). Par exemple, l'activité des longibrachines LGBII (20 résidus) semble diminuée par la présence d'un résidu acide glutamique (Glu) chargé négativement en position 18 sur la chaîne peptidique par rapport à l'activité observée pour les longibrachines LGAI présentant un résidu glutamine (Gln) à cette même position (Cosette *et al.*, 1999). Le résidu Glu induirait une répulsion plus grande des monomères au sein de l'agrégat, diminuant ainsi sa stabilité.

2.5. Activités biologiques des peptaïbols

Les peptaïbols possèdent un large spectre d'actions biologiques, du fait de leur propension à former des canaux ioniques dans les membranes biologiques. L'alaméthicine est le peptaïbol qui a été le plus largement étudié pour ses activités biologiques (Leitgeb *et al.*, 2007; Kredics *et al.*, 2013). Néanmoins, une variation d'activité peut être observée entre différents peptaïbols notamment due à la variation de leur longueur ou aux acides aminés qui les composent. Les principales activités observées sont décrites ci-dessous.

2.5.1. Activité antibactérienne

Les peptaïbols sont connus principalement pour être actifs sur les bactéries à gram positif. Plusieurs études menées avec des peptaïbols longs comme l'alaméthicine (Meyer and Reusser, 1967), les paracelsines (Brückner and Graf, 1983), les saturnisporines (Rebuffat *et al.*, 1993), les trikoningines (Auvin-Guette *et al.*, 1993), les trichorzines (Goulard *et al.*, 1995) ou les atroviridines, polysporines et trichokonines (Ayers *et al.*, 2012) ont montré une inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* mais aucune activité sur les bactéries à gram négatif, telles qu'*Escherichia coli*. Ceci est probablement dû aux liposaccharides de la membrane extérieure des bactéries à gram négatif qui forment une forte barrière de diffusion contre les molécules hydrophobes telles que les peptaïbols (Leitgeb *et al.*, 2007). Néanmoins, Amiche *et al.* (2000) ont observé une inhibition de la croissance d'une bactérie du sol à gram négatif, *Sinorhizobium meliloti*, par l'alaméthicine (concentration minimale inhibitrice, CMI=25 μ M) (Amiche *et al.*, 2000).

Il est essentiel de noter que les mêmes tests réalisés avec des peptaïbols courts ont montré qu'ils n'étaient pas actifs sur les cibles bactériennes. Les peptaïbols à 11 résidus (harzianine HB) se sont révélés inactifs d'après l'étude d'Augeven-Bour *et al.* en 1997 (Augeven-Bour *et al.*, 1997). Néanmoins, les harzianines HK VI et HC IX (peptaïbols à 14 résidus) ont montré une activité sur *S. aureus* mais à des concentrations minimales d'inhibition plus élevées que pour les peptaïbols longs (Rebuffat *et al.*, 1999 ; Rebuffat *et al.*, 2000). Ces différents travaux montrent l'importance de la longueur de la chaîne dans l'activité antibactérienne des peptaïbols. En effet les peptaïbols à moins de 14 résidus ont plus de difficultés à former des pores dans les membranes biologiques.

2.5.2. Activité antivirale

A partir des années 2000, la recherche d'agents permettant de lutter contre le virus de la mosaïque du tabac a permis de découvrir l'activité antivirale des peptaïbols (Yun *et al.*, 2000) (Kim *et al.*, 2000). Plus récemment, Luo *et al.* (2010) ont montré l'induction des mécanismes de défense des plants de tabac contre le virus de la mosaïque du tabac en présence de trichokonines isolées d'un *T. pseudokoningii* (Luo *et al.*, 2010). Ces mêmes trichokonines ont

montré une activité contre le virus de l'hépatite B, ce qui a donné lieu à un dépôt de brevet (Xue, 2015).

2.5.3. Activité antiparasitaire

L'activité antiparasitaire-anthelminthique des peptaïbols a été mise en évidence pour la première fois avec l'antiamoebine, peptaïbol à 16 résidus isolé d'une souche d'*Emericellopsis poonensis* (Thirumalachar, 1968). Une seconde étude relève le même type d'activité avec des peptaïbols à longues séquences, les trichorzianines A et B inhibant la croissance de l'amibe *Dictyostelium discoideum*. La trichorzianine B, ayant un acide glutamique en position 18, a une activité quatre fois plus faible que celle observée pour la trichorzianine A qui comporte une glutamine en position 18. Ceci serait dû à leurs propriétés physico-chimiques différentes (El Hajji *et al.*, 1989). Plus récemment, Ayers *et al.* (2012) ont montré une activité anthelminthique de peptaïbols isolés de deux champignons non identifiés de l'ordre des Hypocréales, (Ayers *et al.*, 2012).

2.5.4. Activité antifongique

Les peptaïbols se sont révélés avoir des effets inhibiteurs de la croissance de plusieurs champignons filamenteux pathogènes appartenant aux genres *Fusarium*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Sclerotinia* et *Verticillium* (Degenkolb *et al.*, 2015) ainsi que sur des levures (Szekeres *et al.*, 2005; Leitgeb *et al.*, 2007). Les peptaïbols à longues séquences se révèlent plus efficaces que les peptaïbols courts. En 2003, Grigoriev *et al.* ont mis en évidence l'activité des peptaïbols sur *Phoma destructiva* (Grigoriev *et al.*, 2003). En 2009, des travaux sur des phytopathogènes des genres *Apionomonina*, *Botryosphaeria*, *Biscognauxia* et *Diplodia* ont montré une activité des peptaïbols à des concentrations de 10 µg/mL (la plus petite concentration testée lors de cette étude) (Maddau *et al.*, 2009).

2.5.5. Activité sur les modèles larvaires animaux

Une toxicité des peptaïbols a été observée sur différents modèles larvaires. En 2006, Favilla *et al.* ont étudié la toxicité de trois peptaïbols analogues de l'alaméthicine, de la paracelsine et de l'antiamoebine sur les modèles invertébrés *Artemia salina* et *Daphia magna*. Des

concentrations de l'ordre du micromolaire ont été nécessaires pour atteindre la dose entraînant la mort de 50% des individus (DL_{50}) après 24h d'exposition. L'alaméthicine a été le composé le plus actif dans chacun des cas (Favilla *et al.*, 2006).

Une activité biologique élevée des peptaïbols isolés de souches de *Trichoderma* d'origine marine a été mise en évidence à plusieurs reprises (Landreau *et al.*, 2002; Poirier *et al.*, 2007). Des travaux réalisés par Ruiz *et al.* en 2007 ont permis de conclure que des peptaïbols à 20 résidus isolés d'une souche d'origine marine de *T. longibrachiatum* présentaient une neurotoxicité sur larves de diptère quinze à trente fois plus élevée lorsqu'ils sont injectés en mélange par rapport à leur administration en tant que composés purs. Les peptaïbols à longue séquence induisent la mort des larves de diptère en un laps de temps de 30 min à 2 h après injection d'une concentration à 20 mg/mL (Ruiz *et al.*, 2007) Il est important de noter que les peptaïbols à 11 résidus isolés de la même souche se sont avérés inactifs lors de ce test.

En 2007, Poirier *et al.* (2007) ont testé l'activité de peptaïbols sur des embryons d'huîtres (*Crossostrea gigas*). Les peptaïbols testés constitués de 11 et 20 résidus avaient été produits par une souche de *T. longibrachiatum* isolée de prélèvements de moules bleues (*Mytilus edulis*). Les peptaïbols longs ont montré une plus grande embryotoxicité par rapport aux peptaïbols courts (Poirier *et al.*, 2007). En 2010 une forte synergie entre l'acide domoïque (une phycotoxine amnésiante) et un peptaïbol à 20-résidus, la longibrachine A-I, isolé de la-même souche marine de *T. longibrachiatum* a été démontrée sur le modèle larve de diptère (Ruiz *et al.*, 2010).

Une activité insecticide a également pu être mise en évidence sur larve de moustique *Culex pipiens* pour différents peptaïbols (alaméthicine, paracelsine, antiamoebine, trichotoxine A-50 et trichoviridine) (Matha *et al.*, 1992). Des DL_{50} entre 110 et 200 $\mu\text{g/mL}$ ont pu être observées après 48h d'exposition et dans tous les cas les mitochondries étaient la cible intracellulaire privilégiée. La DL_{50} observée lors de cette étude pour un peptaïbiotique (Tolypin) était de 0,1 $\mu\text{g/mL}$.

2.5.6. Interactions avec les mammifères

Des études ont été conduites sur la souris dans le but d'évaluer la toxicité des peptaïbols par voie orale ou par voie péritonéale. La toxicité orale observée pour la trichotoxine A, peptaïbol à 18 résidus a été qualifiée de faible puisque les souris nourries à une concentration de 600 mg/kg n'ont présenté aucun symptôme physique ou neurologique pendant quatre mois. Ce résultat pourrait être dû à une dégradation du peptaïbol dans le tractus digestif ou à une incapacité du composé à passer la barrière intestinale. Les mêmes composés injectés par voie intrapéritonéale, entraînent la léthargie puis la mort des individus après une période de 1 h à 3 jours suivant la dose injectée, avec une unique DL_{50} médiane estimée à 4,36 mg/kg. (Hou *et al.*, 1972). D'autres études menées sur l'effet de l'antiamoebine, de la trichotoxine A, de l'aibelline, de l'ampullosporine ou de la trichofumine administrées par voie orale à des rongeurs ou des ruminants révèlent également une faible toxicité de ces composés et arrivent à des conclusions similaires (Degenkolb *et al.*, 2008).

En 2003, Berg *et al.* ont évalué l'activité neuroleptique de solution de peptaïbols (trichofumine A-D,) suite à leur injection intrapéritonéale chez la souris. Ils ont observé, pour toutes les solutions de trichofumine testées à 20 mg/kg de poids corporel, que cette activité se traduisait par une hypothermie et une diminution de l'activité locomotrice des animaux. (Berg *et al.*, 2003). Les travaux de Grigoriev *et al.* réalisés la même année montrent que de 10 à 20 mg/kg de poids corporel, les peptaïbols longs (alaméthicine F30, chrysospermine C et paracelsine A) induisent très rapidement la mort des individus après leur injection intrapéritonéale (Grigoriev *et al.*, 2003). Ovchinnikova *et al.* (2007) ont également mis en évidence une activité neuroleptique de peptaïbols à 16 résidus, les zervamicines IIA et IIB, induisant des perturbations comportementales chez le rat (Ovchinnikova *et al.*, 2007).

Une autre étude menée également sur des rats a révélé, quant à elle, le potentiel des peptaïbols comme traitement neuroleptique. L'ampullosporine A (peptaïbol à 15 résidus, extrait d'une souche de *Sepedonium ampullosporum*) aurait des effets similaires aux traitements neuroleptiques atypiques (par contrôle de la transmission de glutamate) déjà disponibles pour traiter la schizophrénie (Berek *et al.*, 2009).

2.5.7. Interactions avec les cellules animales en culture

Les peptaïbols ont des propriétés hémolytiques, comme par exemple l'alaméthicine sur les mastocytes des rats, les lymphocytes bovins et murins. Ils induisent également une lyse des erythrocytes (Daniel and Rodrigues Filho, 2007) (Brückner *et al.*, 1984; Dathe *et al.*, 1998) (Christoffersen *et al.*, 2015).

Une réduction de la motilité des spermatozoïdes porcins a été observée *in vitro* en présence de peptaïbols (Peltola *et al.*, 2004). En 2012, les travaux de Mikkola *et al.* ont abouti aux mêmes conclusions ; l'activité des extraits bruts de *Trichoderma longibrachiatum* testés sur des spermatozoïdes porcins a été attribuée aux peptaïbols à 11 et 20 résidus produits par ces souches (Mikkola *et al.*, 2012).

Les peptaïbols tels que les trichocellines TCA-II and B-II seraient responsables de la sécrétion de catécholamines par les cellules chromaffines surrénales (Dathe *et al.*, 1998; Daniel and Rodrigues Filho, 2007). Des travaux ont mis en évidence le découplage de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries (Takaishi *et al.*, 1980; Das *et al.*, 1986). Une simulation des enzymes membranaires, telles que l'adénylate et la guanylate cyclase, a également été observée (Szekeres *et al.*, 2005).

L'accumulation de peptides β -amyloïde joue un rôle décisif dans les démences neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Degenkolb *et al.*, 2008). Cependant, une étude réalisée en 2007 par Hosotani *et al.* a montré que des peptaïbols à 14 résidus peuvent inhiber la formation des peptides β -amyloïde dans les neurones du cortex cérébral des porcs de Guinée (Hosotani *et al.*, 2007).

Une activité cytotoxique a également été observée sur différentes lignées cellulaires (Oh *et al.*, 2002; Peltola *et al.*, 2004; Mitova *et al.*, 2008; Ayers *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015). La suppression des cellules tumorales, l'apoptose à médiation par le calcium et l'autophagie des cellules cancéreuses hépatiques chez l'Homme ont été observées après traitement par des peptaïbols (Shi *et al.*, 2010). Ils induiraient également une mort programmée chez les cellules de champignons pathogènes des plantes (Shi *et al.*, 2012).

2.5.8. Interactions des peptaïbols avec les plantes

Schrimböck *et al.* (1994) et Lorito *et al.* (1996) ont relevé dès les années 90 des interactions entre les peptaïbols et les plantes (Schirmbock *et al.*, 1994; Lorito *et al.*, 1996). Sous conditions *in vitro*, la formation parallèle de peptaïbols à 19-résidus (trichorzianines A et B) et d'enzymes hydrolytiques tels que des chitinases et des β -1,3-glucanases a été observée. Ces travaux ont permis de conclure à l'action synergique des peptaïbols et des hydrolases dans l'activité antifongique de *T. atroviride* vs *Botrytis cinerea*.

En 2010, Luo *et al.* (2010) relèvent l'induction d'une résistance systémique chez le plant de tabac (*Nicotina tabacum*) contre le virus de la mosaïque du tabac (TMV) (Luo *et al.*, 2010). Viterbo *et al.* ont rapporté en 2008 l'induction d'une résistance systémique chez le plant de concombre (*Cucumis sativus*) par des peptaïbols à 18 résidus produits par une souche de *T. virens* (Viterbo *et al.*, 2007). Le peptaïbol à 19 résidus chrysospermine fourni une protection à *Nicotina tabacum* contre le TMV (Kim *et al.*, 2000).

L'alaméthicine, peptaïbols à 20-résidus produit par *T. virens*, a montré l'induction d'une réponse défensive chez *Phaseolus lunatus* (Engelberth *et al.*, 2001) et *Arabidopsis thaliana* (Chen *et al.*, 2003).

2.5.9. Conclusion des activités des peptaïbols

Du fait de leur facilité à former des pores dans les bicouches lipidiques et du fait de l'universalité de présence de ce type de membranes dans les organismes vivants, il était logique que les peptaïbols aient de très nombreuses activités biologiques. C'est ce que nous avons voulu montrer dans cette partie « activité biologique ». Il apparait que les différentes activités déjà observées ne sont pas liées entre elles mais uniquement dues à leurs propriétés membranaires.

En particulier il est intéressant de noter l'activité antifongique qui pourrait expliquer en partie l'utilisation en biocontrôle des champignons qui les produisent. C'est ce que nous étudierons plus en détail dans la quatrième partie de ce mémoire. Pour cela il est important de noter la relative inactivité des peptaïbols par voie orale constatée sur mammifères ce qui permet d'envisager leur utilisation pour le traitement de plantes alimentaires.

2.6. Méthodologies d'obtention, de séquençage et d'analyse des peptaïbols

2.6.1. Production et isolement

Les souches des genres producteurs de peptaïbols (*Trichoderma* /*Hypocrea*, *Sepedonium*, *Stilbela*, *Gliocladium*, *Emericellopsis*, *Acremonium*, *Apiocrea*) sont généralement cultivées sur milieux synthétiques solides ou liquides. Les milieux utilisés sont divers et influent sur la quantité des peptaïbols produits (Kirschbaum *et al.*, 2003; Reiber *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2010). Ces milieux peuvent être adaptés à l'écologie des espèces cultivées et peuvent, par exemple, contenir de l'eau de mer dans le cas de l'étude de souches d'origine marine (Ruiz *et al.*, 2007).

Sur un milieu donné, la quantité et la qualité des peptaïbols produits dépend de la souche étudiée. L'extraction des peptaïbols de la biomasse fongique est généralement réalisée à l'aide de solvants organiques. En effet, en raison du caractère amphiphile de ces molécules, les solvants utilisés ne sont pas aqueux comme c'est le cas généralement pour les peptides mais sont des solvants moyennement polaires tels que le n-butanol ou un mélange méthanol/dichlorométhane (Wiest *et al.*, 2002).

Afin de les purifier, les peptaïbols ainsi extraits, sont séparés en groupes par différentes techniques chromatographiques telles que la chromatographie d'exclusion sur Sephadex LH-20 (Vizcaíno *et al.*, 2006), la chromatographie sur silice polaire simple ou greffé diol (chromatographie liquide sous vide (CLV), chromatographie basse pression (CLBP) ou flash chromatographie) (Mohamed-Benkada *et al.*, 2006) (Ruiz *et al.*, 2007) (Poirier *et al.*, 2007) (Ayers *et al.*, 2012) ou la chromatographie haute performance (CLHP) en phase inverse sur silice greffée C₈ ou C₁₈. (Degenkolb *et al.*, 2006). L'extraction en phase solide (SPE) sur silice C₁₈ ou sur résine XAD est également utilisée pour séparer les peptaïbols suivant leurs longueurs (Stoppacher *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2009). Les peptaïbols étant produits en mixtures micro-hétérogènes, il est très difficile de les purifier individuellement par ces techniques de séparation.

2.6.2. Identification

Afin de vérifier la présence de peptaïbols dans les fractions purifiées, un contrôle par chromatographie sur couche mince (CCM) peut être envisagé. L'orcinol peut alors être utilisé comme révélateur négatif des peptaïbols. En effet, l'orcinol est un révélateur spécifique des molécules glycoconjuguées. Il colore la plaque de silice en jaune sous l'action de la chaleur et les peptaïbols apparaissent sous forme de spots blancs (Ruiz, 2007). Une autre façon de révéler peut également être réalisée : vaporisation d'H₂O, séchage et application d'une solution de Cl₂ / iodure de potassium / N,N,N',N'-tetraméthyl-4,4'-diaminodiphenylmethane (TDM) (Krause *et al.*, 2007). Cette méthode ne permet pas de différencier les groupes de peptaïbols et demande des quantités importantes d'analytes. Une analyse des fractions purifiées par spectrométrie de masse apparaît alors plus judicieuse pour le contrôle des étapes de purification.

2.6.3. Séquençage des peptaïbols

Les caractéristiques structurales particulières des peptaïbols rendent difficile leur analyse séquentielle par les techniques classiquement appliquées à l'étude des peptides (dégradation d'Edman, amplification de l'ADN). D'ailleurs, La dégradation d'Edman appliquée aux peptides contenant des acides aminés α,α -dialkyl (comme l'Aib) est donc rarement mentionnée dans la littérature (Brückner *et al.*, 1991; Kimonyo and Bruckner, 2013). La spectrométrie de masse ayant connue de nombreuses avancées et étant devenue ces dernières décennies une technique couramment utilisée dans les laboratoires, l'analyse séquentielle de nombreuses molécules, même en mélange, a été facilitée. Dans la littérature, les méthodes d'ionisation les plus couramment employées sont le bombardement par atomes rapides (FAB) (Wiest *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2005; Kimonyo and Bruckner, 2013), l'électronébulisation (ESI) (Psurek *et al.*, 2006; Poirier *et al.*, 2007) (Kimonyo and Bruckner, 2013) et la désorption laser assistée par matrice (MALDI) (Vizcaíno *et al.*, 2006; Neuhof *et al.*, 2007; Ovchinnikova *et al.*, 2007; Brito *et al.*, 2014).

L'ionisation FAB est une méthode d'ionisation à haute énergie, ce qui implique l'acquisition de spectres de masse permettant, certes, l'observation d'ions pseudomoléculaires protonés $[M+H]^+$ ou d'adduits $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$ mais accompagnés d'un grand nombre de fragments

non spécifiques (Iida *et al.*, 1994). D'après Degenkolb *et al.* (2013), dans le cas des peptaïbols produits en mélange microhétérogène, la présence de ces fragments peut compliquer la détermination des séquences (Degenkolb *et al.*, 2003). L'utilisation de sources d'ionisation plus douces (MALDI, ESI) est alors préférable. Elles conduisent à la formation d'ions pseudomoléculaires stables $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+nH]^{n+}$ et $[M+nNa]^{n+}$ à partir desquels il est facile de déterminer la masse moléculaire des composés. La séquence d'acides aminés est déterminée par fragmentation MS/MS ou MS^n en générant des ions par dissociation induite par collision (CID) de l'ion parent sélectionné sur un triple quadripôle ou une trappe ionique (Degenkolb *et al.*, 2003). La sélection de l'ion parent doit se faire sur une fenêtre de masse précise afin de caractériser sans ambiguïté les ions fragments (c'est ce que nous verrons en pratique dans la troisième partie de ce mémoire).

En 2006, Krause *et al.* ont introduit la notion de peptaïbiome pour définir l'ensemble des peptides riches en acides aminés non protéinogéniques (Aib, Iva), produits par des organismes fongiques, en référence au protéome et au peptidome (Krause *et al.*, 2006). Le terme peptaïbiomique fait référence à l'ensemble des techniques analytiques de détermination du peptaïbiome. Les auteurs proposent en ce sens une méthode regroupant une extraction des peptaïbiotiques sur phase solide (SPE) avec des cartouches C_{18} suivie de leur analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse avec un analyseur à trappe ionique équipée d'une source à électronébulisation (HPLC-ESI-MS). Cette technique ne permet malheureusement pas la détermination des isomères d'acides aminés.

La détermination des acides aminés isomériques Leu/Ile peut néanmoins se faire par spectrométrie de masse équipée d'une source FAB (Landreau, 2001). Pour ce qui est de la différenciation Val/Iva, des analyses par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (Kimonyo and Bruckner, 2013) avec des détecteurs à ionisation de flamme ou spectrométrie de masse, des analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Rebuffat *et al.*, 1999) sont nécessaires. Dans le cas de la CPG, une hydrolyse préalable du peptide doit être réalisée. La comparaison des temps de rétention avec des acides aminés standards permet l'obtention de la chiralité de ces acides aminés sur colonne chromatographique chirale, mais elle ne permet pas de connaître précisément la position de l'acide aminé étudié dans la séquence contrairement à

la RMN. La RMN, quant à elle nécessite une grande pureté des molécules à analyser, ce qui peut poser problème dans le cas des peptaïbols souvent produits en mélange microhétérogène.

Afin de connaître la chiralité des acides aminés possédant un carbone asymétrique, en plus de leur forme isomère, il est également possible de les dériver par le réactif Marfey (1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide ou FDAA) (Bhushan and Brückner, 2011). La détection des acides aminés dérivés se fait généralement par un spectromètre UV à 340 nm.

La fragmentation MS/MS et MS^n des ions pseudomoléculaires générés par les peptaïbols en mode de détection positif conduit à la présence de fragments spécifiques dont la nomenclature a été décrite par Roepstorff et Fohlman en 1984 puis complétée par Biemann en 1988 (Roepstorff and Fohlman, 1984; Biemann, 1988). Les fragmentations se font au niveau des liaisons peptidiques, quelle que soit la technique d'ionisation employée. Le clivage peut avoir lieu au niveau de trois types de liaisons C α -C, C-N et N-C α donnant naissance à six fragments : a_n , b_n et c_n contenant l'extrémité N-terminale si la fragmentation se fait à partir de l'extrémité C-terminale et x_n , y_n et z_n contenant l'extrémité C-terminale si la fragmentation se fait à partir de l'extrémité N-terminale (Figure 1-16).

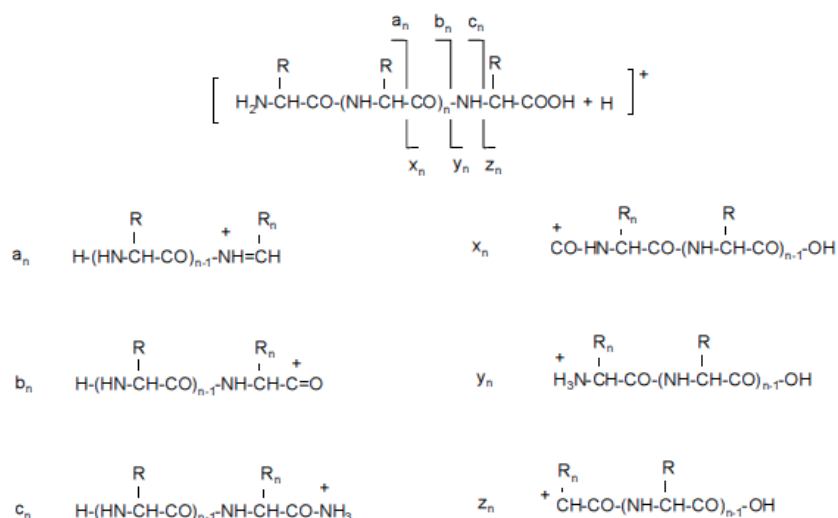


Figure 1-16 : Voies de fragmentation privilégiées des peptides en spectrométrie de masse MS^n (Poirier, 2007)

Les ions principalement générés sont les ions acylium b_n car ils sont particulièrement stables (Sabareesh and Balaram, 2006).

La liaison Aib-Pro ou Aib-Hyp étant fragile, elle induit un clivage préférentiel (Pandey *et al.*, 1977; Brückner and Przybylski, 1984; Rebuffat *et al.*, 1989). En effet, le groupe imino de la proline ou de l'hydroxyproline, contenu dans un cycle à cinq atomes, a une plus grande affinité protonique que les autres liaisons amides du peptide. La protonation et le clivage de la liaison amide de la proline sont alors facilités et accentués par l'encombrement stérique du carbone α, α -dialkylé de l'Aib (Rebuffat *et al.*, 1995). En milieu acide, ce clivage induit, selon deux mécanismes en compétition, la génération d'un ion acylium b_n N-terminal, d'une amine primaire ainsi que d'un ion ammonium diprotonné y_n C-terminal et d'une cétène (Poirier, 2007; Ruiz, 2007) (Figure 1-17).

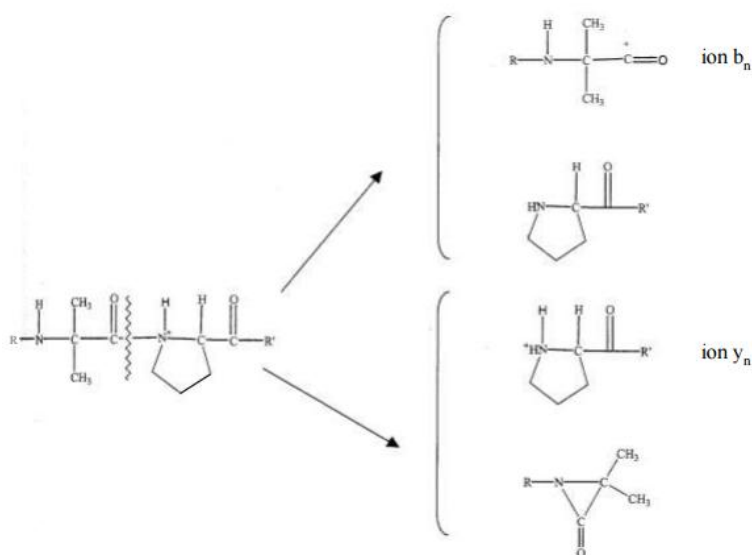


Figure 1-17 : Fragments générés par la rupture préférentielle Aib-Pro ((Poirier, 2007))

Chaque étape de fragmentation va conduire à la perte d'un résidu constituant la séquence. Les différences de masse obtenues entre chaque fragment vont permettre de reconstituer la séquence peptidique en remontant de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale en mode d'ionisation positif (analyse des ion b_n/a_n) et de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale en mode d'ionisation négatif (analyse des ions y_n) (Ruiz, 2007).

souches de *T. longibrachiatum* par Mikkola *et al.* en 2012 (Mikkola *et al.*, 2012). Lors des travaux de Poirier *et al.* (2007) les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été déterminées à 2,5 et 8,3 µg/mL respectivement pour le standard alaméthicine dans la matrice sédiments marins. La concentration totale de peptaïbols déterminée dans les sédiments prélevés à La Rochelle a été de $5,2 \pm 2,1$ ng/g (Poirier *et al.*, 2007).

Désireux d'étudier l'utilisation des souches marines de Trichoderma en biocontrôle et voulant développer des méthodes de sélection de ces souches basées entre autre sur leur production de peptaïbols, nous développerons dans ce mémoire (partie 5) une méthode de dosage des peptaïbols adaptée aux cultures fongiques.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes de l'ensemble de l'étude

Dans ce chapitre, le détail des origines et des espèces des souches fongiques de *Trichoderma* étudiées, ainsi que la réalisation de leur culture sur milieu solide seront abordées. Cette partie fait également état des différents appareillages et méthodes, communs aux différents chapitres du manuscrit, utilisés dans l'extraction, la purification et l'analyse des peptaïbols.

1. Cultures fongiques des souches de *Trichoderma*

1.1. Souches de *Trichoderma*

Plusieurs souches de *Trichoderma* ont été sélectionnées pour leur production de sous-groupes de peptaïbols variés. Ces souches ont été identifiées sur la base de l'amplification et du séquençage des espaceurs transcrits internes (ITS) de leur ADN ribosomal codant les sous unités 18S, 5,8S et 28S et en utilisant l'outil TrichOKEY disponible en ligne pour comparer leurs séquences avec celles déjà répertoriées dans la base de données (Druzhinina *et al.*, 2005). Leur espèce, leur origine, leur référence Genbank ainsi que les chapitres dans lesquels elles apparaissent dans ce manuscrit sont répertoriés dans le tableau suivant.

Tableau 2-1: Souches de *Trichoderma* sélectionnées et citées dans les différents chapitres de ce manuscrit

Souche	Espèce	Isolé de	Origine géographique	Référence Genbank	Chapitre
MMS 13	<i>T. harzianum</i>	Coques	Le Croisic	JQ653065	5
MMS 19	<i>T. citrinoviride</i>	Coques	Le Croisic	JQ608473	4 et 5
MMS 58	<i>T. longibrachiatum</i>	Moules	La Tara	JQ653055	5
MMS 151	<i>T. longibrachiatum</i>	Moules	Tharon	JQ653057	5
MMS 510	<i>T. reesei</i>	Sédiments	La Couplasse	GU947793	5
MMS 639	<i>T. atroviride</i>	Eau de mer	La Couplasse	JQ653056	5
MMS 675	<i>T. sp. S466</i>	Sédiments	La Couplasse	JQ653066	3
MMS 755	<i>T. capillare</i>	Sédiments	Le collet	JQ653068	5
MMS 852	<i>T. capillare</i>	Sédiments	Port-Giraud	JQ653070	5
MMS 927	<i>T. atroviride</i>	Sédiments	Le Croisic	GU947796	3, 4 et 5
MMS 975	<i>T. ghanense</i>	Sédiments	Le Croisic	GU947792	5
MMS 1255	<i>T. sp. S466</i>	Sédiments	Port du bec	JQ653081	3 et 4
MMS 1541	<i>T. pleuroticola</i>	Coques	Bonne Anse	JQ653064	5
MMS 1512	<i>T. pleuroticola</i>	Moules	Bonne Anse	JQ653084	3 et 4
T 22 (ATCC 20847)	<i>T. harzianum</i>	BCA Commercial	-	-	4 et 5

Les espèces de *Trichoderma* sélectionnées sont variées et ont des origines diverses. Elles sont majoritairement issues du milieu marin et les échantillons à partir desquels elles ont été isolées sont géographiquement localisés sur la côte Nord-Est de l’Océan Atlantique. Quinze souches ont été sélectionnées, dont 2 sont de l’espèce *harzianum*, 2 sont de l’espèce *pleuroticola*, 2 de l’espèce *atroviride*, 2 sont des *Trichoderma longibrachitum*, 2 sont de l’espèce *capillare*, et seulement une souche est représentative de chacune des espèces suivantes : *Trichoderma ghanense*, *Trichoderma reesei* et *Trichoderma citrinoviride*. Deux souches appartenant à une espèce nouvellement décrite par Jaklitsch et Voglmayr en 2015 (*T.sp.S466*) apparaissent également dans ce tableau (Jaklitsch and Voglmayr, 2015) (Tableau 2-1, Annexe 2 et cf. Chapitres 3 et 4). Parmi les 15 souches d’intérêt, une est utilisée dans des formulations

commerciales appliquées dans le domaine du biocontrôle. Il s'agit de la souche référencée T 22, isolées du milieu terrestre et commercialisée par la firme néerlandaise Koppert®.

1.2. Mise en culture des souches de *Trichoderma*

La culture des *Trichoderma* est réalisée sur des milieux semi-empiriques solides afin d'étudier la production des peptaïbols. Le milieu de culture DCA (dextrose caséine agar) est principalement utilisé pour la culture des différentes souches de *Trichoderma* au laboratoire. Ce milieu est préparé avec de l'eau de mer synthétique afin de mimer les conditions de l'environnement marin. La gélose nutritive est stérilisée par autoclavage (20 min à 120°C) puis le milieu de culture est coulé dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre pour les études qualitatives et le dosage de la production de peptaïbols et dans des boîtes de Petri de 15 cm pour la production et l'isolement des peptaïbols en quantité plus importante. Après solidification de la gélose, les boîtes sontensemencées sous hotte à flux laminaire afin d'éviter toute contamination. Des fragments de mycélium et de conidies (spores assurant la reproduction asexuée du champignon) sont prélevés à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et repiqués en trois points équidistants. Les cultures sont mises à incuber le temps nécessaire au recouvrement de toute la surface gélosée, à 27°C (cf. Chapitre 3 et 5). La température de 27°C a été déterminée comme étant optimale pour les cultures de *Trichoderma* sur milieu préparés à base d'eau de mer synthétique, par des travaux réalisés au laboratoire avant le début de cette thèse. Le champignon se développe en formant des cercles concentriques de couleur alternant le blanc et le vert à partir du point d'impact comme expliqué dans le chapitre 1.

Un deuxième milieu a été utilisé pour la culture des *Trichoderma* et des champignons pathogènes (*Alternaria brassicicola* et *Botrytis cinerea*) décrits ultérieurement dans le chapitre 4. Il s'agit du milieu PDA pour « potato dextrose agar », préparé à base d'eau distillée afin de se placer dans des conditions de culture proches des caractéristiques de développement dans l'environnement terrestre. Ce milieu a donc été utilisé pour la culture des champignons lors de l'étude sur l'utilisation potentielle des souches de *Trichoderma* d'origine marine en biocontrôle, ainsi que pour l'étude de l'induction de métabolites fongiques en co-culture antagoniste/pathogène. La température d'incubation des cultures fongiques de 24°C a été

appliquée lors des ces travaux, afin de placer les champignons pathogènes (habituellement cultivés à 24°C sur milieu préparé à base d'eau distillée) et les *Trichoderma* dans les mêmes conditions de culture.

Un dernier milieu a été employé pour réaliser les solutions nécessaires à la réalisation des mesures d'inhibition de croissance fongique par néphélométrie LASER. Il s'agit du milieu PDB, pour « potato dextrose broth ». La composition des différents milieux est résumée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2-2: Composition des milieux de cultures

DCA	PDA	PDB
Dextrose : 40 g	Dextrose : 20 g	Dextrose : 20 g
Digestion enzymatique de caséine : 10 g	Potato extract : 4 g	Potato extract : 4 g
Agar : 15 g	Agar : 15 g	Eau distillée: 1 L
Eau de mer synthétique: 1 L	Eau distillée: 1 L	

2. Isolement et purification des peptaïbols

La biomasse fongique produite pendant la culture des *Trichoderma* est raclée de la surface gélosée. Elle est ensuite extraite par macération sous agitation dans un mélange dichlorométhane/méthanol (2:1 puis 1:2, v/v) dont les volumes varient en fonction de la quantité de biomasse (40 mL par g de biomasse fraîche). La biomasse macère pendant 2 h dans chaque mélange avant filtration sur filtre papier. Le filtrat est récupéré puis lavé avec ¼ de son volume d'eau distillée. La phase organique est alors séchée et l'extrait brut est ainsi obtenu (cf. Chapitre 5 : Les peptaïbols seront quantifiés directement dans ces extraits bruts). Par la suite, plusieurs étapes de purification sont nécessaires à l'obtention des peptaïbols :

❖ Chromatographie liquide sous vide

L'extrait brut obtenu pour les grandes cultures sur boîte de Petri de 15 cm de diamètre est aliquoté (~ 220 mg) et purifié par une étape de chromatographie sous vide (VLC) avec 2 g d'une phase silice greffée Diol (Chromabond OH, porosité 60 Å, granulométrie 45 µm, Macherey-Nagel). L'élution est assurée par 3 fractions successives de 50 mL d'un mélange dichlorométhane/méthanol en proportions différentes (92:8, 90:10 puis 85:15 ; v/v). Le choix

des solvants a été déterminé par des optimisations préalables montrant que la majorité des peptaïbols était éluee dans la fraction 90:10 (v/v) (Mohamed-Benkada, 2006; Ruiz *et al.*, 2007). Une analyse en spectrométrie de masse basse résolution des différentes fractions obtenues est réalisée afin de contrôler la présence des peptaïbols dans les fractions et ainsi en regrouper le maximum avant la deuxième étape de purification.

❖ Chromatographie liquide sur colonne ouverte de gel de silice

Une étape de chromatographie liquide est ensuite réalisée sur les fractions VLC enrichies sur colonne ouverte de gel de silice (6 g, 2x20 cm, Chromagel, porosité 60 Å, granulométrie 35-70 µm, SDS). L'élution est réalisée par un gradient discontinu d'un mélange dichlorométhane/méthanol de polarité croissante, allant de 98:2 à 80:20 (v/v). Les peptaïbols sont principalement élués dans les fractions obtenues en utilisant les mélanges dichlorométhane/méthanol de 90:10 à 80:20 (Ruiz *et al.*, 2007).

❖ Chromatographie flash

Dans certains cas, compte tenu de la quantité de produit assez faible à purifier, la chromatographie flash (PuriFlash™430evo, Interchim®) est utilisée à la place d'une colonne ouverte. Pour cela, une cartouche de phase silice de 4 g (silica std 50 µm, porosité 60 Å, granulométrie 50 µm, Interchim) est utilisée et l'échantillon (~ 90 mg) est déposé par voie liquide. Il est alors élué par un mélange dichlorométhane/méthanol de polarité croissante mimant les paliers d'élution de la chromatographie liquide sur colonne ouverte de gel de silice et à une pression de 0 bar afin de se placer dans les mêmes conditions de pression.

❖ Chromatographie liquide haute performance

La dernière étape de purification consiste en une chromatographie liquide haute performance (HPLC), sur les fractions précédemment enrichies en peptaïbols. Deux chaînes chromatographiques ont été employées alternativement et sont composées pour la première d'une pompe Agilent 1050 (Agilent technologies®), d'un dégazeur G1322A (Agilent 1200, Agilent technologies®), d'un injecteur vanne Rhéodyne, boucle 750 µL, d'un collecteur de fractions Gilson 201 (Gilson, Inc. Middleton, USA) ainsi que d'un détecteur monochromatique VWD

G1314B (Agilent 1200, Agilent technologies®) et pour la deuxième d'une pompe 305 pump (Gilson, Inc. Middleton, USA), d'un injecteur vanne Rhéodyne, boucle 750 μ L et d'un détecteur UV 115 (Gilson, Inc. Middleton, USA). Cette étape est réalisée en phase inverse sur une colonne semi-préparative de silice greffée C₁₈ (Inertsil ODS-3 RP18, 10x250 mm, 5 μ m, Interchim). Des aliquots de 5 mg sont déposés et l'élution est assurée en mode isocratique avec un mélange méthanol/eau (85:15, v/v) à un débit constant de 5 mL/min. la detection UV s'effectue à une longueur d'onde de 230 nm (longueur d'onde d'absorption des peptaïbols). Chaque pic ou épaulement visible sur le chromatogramme est collecté séparément. Les fractions collectées sont alors analysées par spectrométrie de masse basse résolution sur un appareil équipé d'un analyseur de masse trappe ionique, le LCQ™. Ceci permet de vérifier le degré de pureté des fractions enrichies en peptaïbols, après injection directe dans la source.

3. Spectromètres de masse

Après avoir vérifié le degré de pureté des fractions enrichies en peptaïbols collectées, deux spectromètres de masse ont été nécessaires afin d'identifier, de séquencer ou de quantifier les peptaïbols produits par différentes souches de *Trichoderma*. **Spectromètre de masse basse résolution**

L'analyse et la détection par spectrométrie de masse des fractions collectées après purification de l'extrait brut obtenu par macération de la biomasse fongique dans des solvants organiques (chapitres 3, 4 et 5) est réalisée sur un appareil basse résolution de type trappe ionique (LCQ™, Thermo Fisher Scientific®). Ce spectromètre de masse est également utilisé pour réaliser le séquençage de nouveaux peptaïbols (chapitre 3) ainsi que le dosage des peptaïbols dans les extraits bruts de *Trichoderma* (chapitre 5). Il est équipé d'une source d'ionisation à électronébulisation (ou electrospray, ESI) couplée à un analyseur de masse à trappe d'ions quadripolaire (IT) (Figure 1-1).

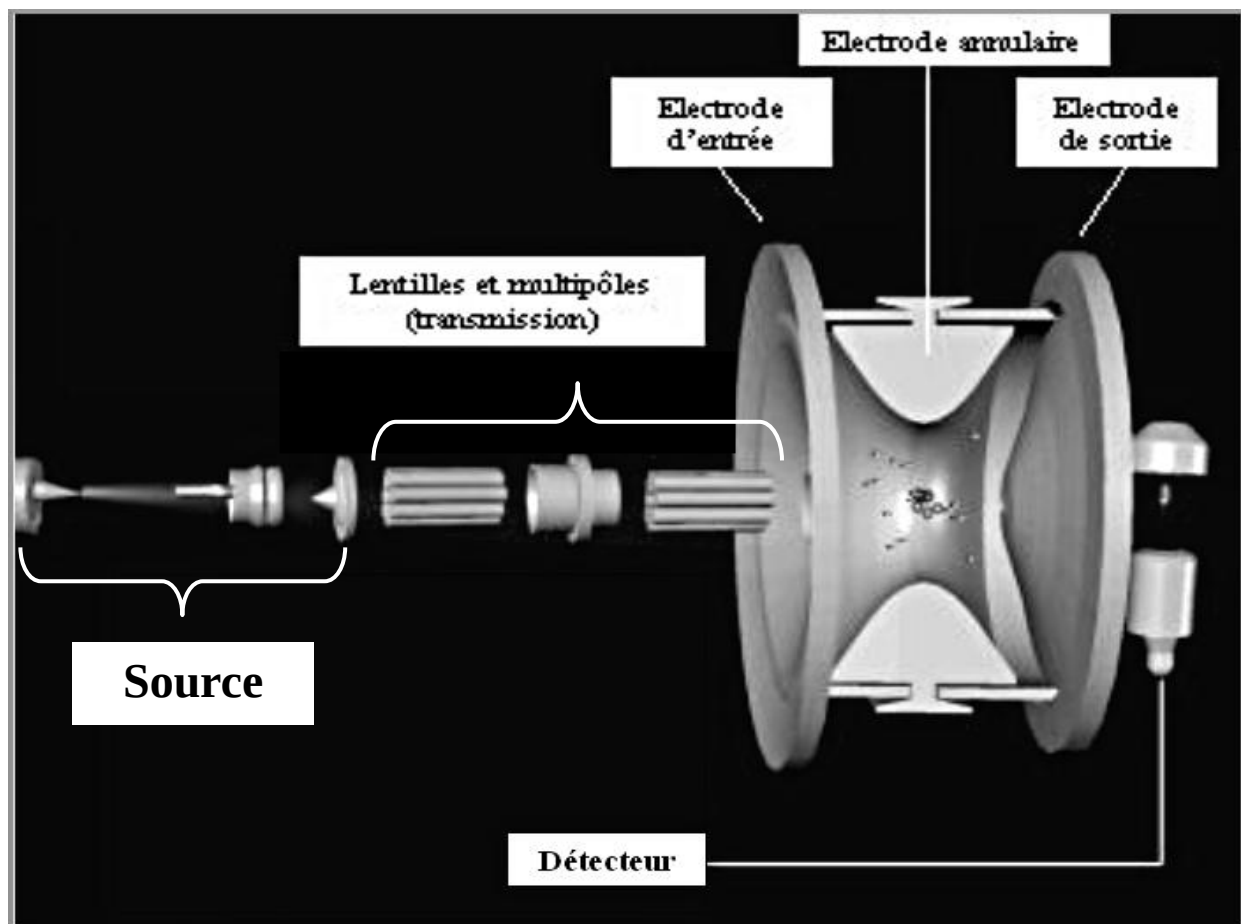


Figure 1-1: Configuration éclatée du spectromètre de masse à trappe d'ion équipé d'une source d'ionisation électrospray. (image site web CNRS) (cbm.cnrs-orleans.fr, 1999)

La source electrospray permet une ionisation douce des molécules d'intérêt à pression atmosphérique. Le principe de l'électronébulisation est d'appliquer un fort champ électrique (3 à 6 kV) à l'extrémité du capillaire d'où arrive le liquide, ce qui entraîne une accumulation de charge. En mode positif, l'application de ce champ induit une migration des ions positifs vers la contre électrode. En mode négatif, ce sont les ions négatifs qui migrent vers la contre électrode. Lorsque la répulsion des charges positives combinée à l'attraction du champ électrique dépasse la tension de surface du liquide, il se forme alors un cône de Taylor (Kearle and Verkerk, 2009) (Figure 2-2).

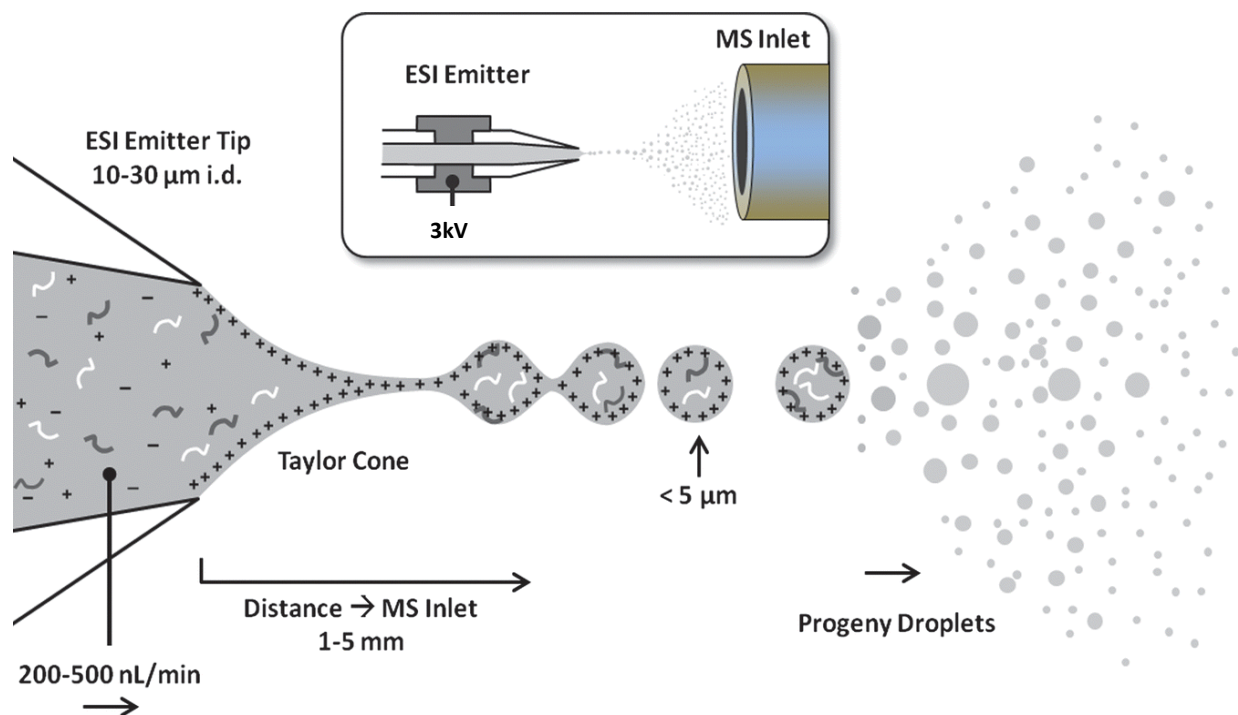


Figure 2-2: Illustration du phénomène de cône de Taylor, d'après Adam M. Hawkrige (Hawkrige, 2014)

Un nuage de gouttelettes chargées (spray) est alors formé sous l'action du champ électrique et d'un gaz de nébulisation (N_2). Le gaz auxiliaire (N_2) évapore ensuite le solvant des gouttelettes (désolvatation), les rendant plus petites et de charge constante. La désolvatation est améliorée par l'augmentation du voltage appliqué sur le cône d'échantillonnage (V_c).

Lorsque la limite de Rayleigh est atteinte, c'est-à-dire lorsque la densité de charge est suffisamment importante pour dépasser la tension de surface des gouttelettes, ces dernières explosent sous l'effet des répulsions coulombiennes. Les ions passent alors de la solution vers la phase gazeuse et sont guidés par des potentiels électriques vers l'interface source-analyseur par l'orifice de la contre électrode, où les molécules chargées positivement (dans le cas d'une ionisation positive) vont pouvoir entrer dans l'analyseur. Un ensemble de skimmers, c'est-à-dire un ensemble d'orifices d'écramage, canalisent les ions vers l'analyseur, dans lequel règne un vide poussé (Figure 2-3).

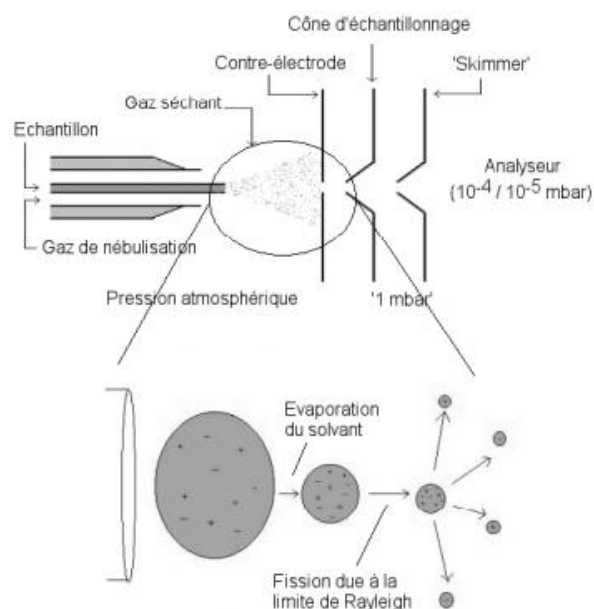


Figure 2-3: Production de gouttelettes à l'interface de la source électrospray (Kadar, 2011)

Différents modes d'introduction dans la source peuvent être envisagés tels que l'injection directe (ou perfusion) ou le couplage avec la chromatographie liquide (HPLC). Au cours de ce travail de thèse, l'injection directe a été employée lors du séquençage des peptaïbiotiques ou de la vérification du fractionnement des extraits bruts (cf. chapitre 3 et 4) tandis que le couplage avec l'HPLC a été utilisé lors du dosage des peptaïbols dans les extraits bruts de *Trichoderma* (cf. chapitre 5). Le solvant de solubilisation de l'échantillon joue un rôle important dans l'ionisation des molécules d'intérêt. En effet, l'ajout d'acide va permettre de favoriser leur ionisation en mode positif. Les solvants polaires volatils de tension de surface et de conductivité faibles seront privilégiés (méthanol, acétonitrile) pour la solubilisation de l'échantillon. Dans le cas des travaux décrits dans ce manuscrit, le méthanol est le solvant de solubilisation des échantillons.

Différents paramètres sont ajustables dans la source afin d'optimiser la sélection des ions d'intérêt :

- La tension appliquée à la sortie de l'aiguille de l'électrospray : une optimisation de la valeur est nécessaire suivant le mode de détection (positif ou négatif). Cette valeur sera positive dans le

cas d'une détection des cations et négative pour les anions. Le voltage appliqué sera compris entre 3 et 6 kV, ce qui permet une bonne transmission des ions et évite leur fragmentation dans la source.

- Les débits de gaz vecteur et auxiliaire : Une optimisation est nécessaire. Ces gaz sont constitués d'azote et permettent respectivement la formation du spray et l'évaporation du solvant. Le débit de gaz vecteur est fixé à 60 unités arbitraires (UA) pour un échantillon injecté au débit de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le débit de gaz auxiliaire est quant à lui généralement fixé entre 10 et 20 UA.

- La température ainsi que le voltage du capillaire chauffé : ils peuvent également être optimisés. La température optimale du capillaire chauffé dépend de l'analyte ciblé, mais est souvent comprise entre 150 et 300°C. Une température élevée favorise la désolvatation des ions. Le voltage appliqué à la sortie du capillaire chauffé est de polarité identique à celle des ions d'intérêt afin de les repousser vers l'analyseur. Il est généralement compris entre 0 et $\pm 132 \text{ V}$.

- Le voltage appliqué sur la lentille tubulaire (tube lens offset voltage). Ce voltage est facultatif et est compris entre 0 et $\pm 40 \text{ V}$. Il est de polarité similaire à celle des ions analysés. Il permet d'accélérer les ions dans le gaz vecteur et d'induire des collisions qui vont favoriser la désolvatation des ions. Si le voltage est trop important, une fragmentation des ions dans la source, appelée dissociation induite par collision (CID) peut se produire.

Après être passés au travers de la source, les ions arrivent au niveau du système optique de transmission des ions qui consiste en un ensemble de deux octopôles séparés par une lentille. Un champ électromagnétique guide et accélère les ions vers l'analyseur. La lentille placée entre les deux octopôles participe non seulement à la focalisation des ions mais elle permet également d'écrémer les grosses particules chargées responsables du bruit de fond. Les voltages des octopôles et de la lentille les séparant peuvent être optimisés. La tension appliquée sur les octopôles varie de 0 à $\pm 135 \text{ V}$ et celle appliquée sur la lentille de 0 à $\pm 300 \text{ V}$. Les voltages employés seront l'inverse de ceux des ions analysés.

Puis, les ions arrivent finalement au niveau de l'analyseur. Ce dernier est une trappe d'ions quadripolaire, composée d'un ensemble de trois électrodes : une électrode annulaire centrale (ring electrode) et des calottes, supérieure et inférieure (cap electrodes). L'ensemble forme une cavité permettant le piégeage des ions, leur fragmentation et l'analyse de leurs masses. Les calottes d'une part et l'électrode annulaire d'autre part sont asservies à une tension respective $+\phi_0$ et $-\phi_0$ qui a pour effet de créer une tension quadripolaire au sein de la trappe. A l'intérieur de la trappe, les ions suivent une trajectoire oscillante stable et close en forme de courbe de Lissajous, répondant aux équations de Mathieu. Lorsque la tension alternative est augmentée progressivement, les ions sont déstabilisés et expulsés de manière successive de la trappe. Le spectromètre de masse à trappe ionique est très sensible et ne permet qu'un nombre limité d'ions dans l'enceinte de la trappe. En effet, les répulsions entre les ions induisent une augmentation du rayon de leur trajectoire, ce qui donne lieu à des variations dans leur expulsion de la trappe. Afin de les confiner au centre de la trappe, une faible pression d'hélium est appliquée (Figure 2-4).

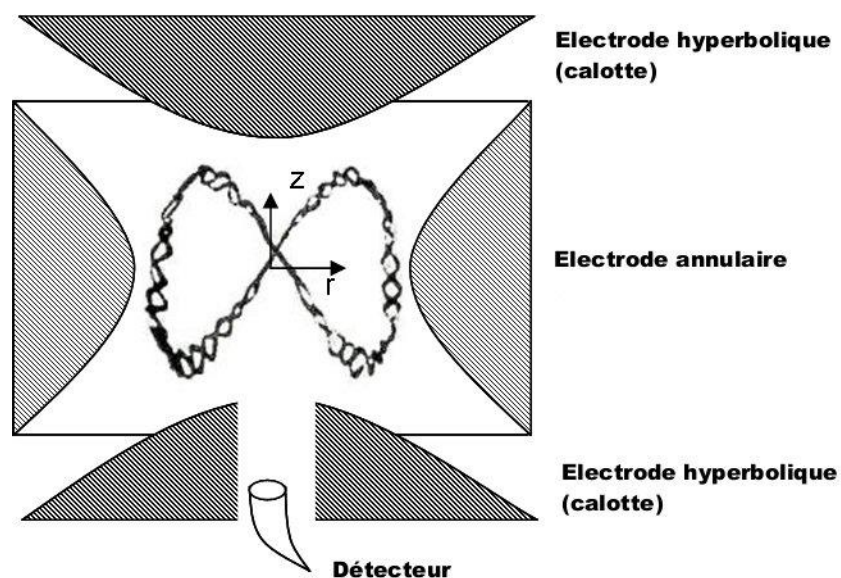


Figure 2-4: Schéma de la trappe ionique quadripolaire et trajectoire des ions. (image site web [doping.chuv\(doping.chuv\)](http://doping.chuv(doping.chuv)))).

Ici aussi différents paramètres sont ajustables pour favoriser la détection des ions :

- Le temps de remplissage de la trappe : il peut être optimisé de quelques millisecondes à 1 seconde afin de contrôler le nombre d'ions piégés dans la trappe. Ceci évite d'avoir un nombre d'ions trop important dans la trappe, ce qui diminuerait la résolution et la précision de la mesure par une augmentation des effets de charge.

- La vitesse de balayage ainsi que le mode d'analyse : la vitesse de balayage des tensions correspond à la vitesse d'éjection des ions. Plus elle est lente plus la résolution est grande. Cinq modes d'analyse sont disponibles sur le LCQ, permettant d'obtenir différentes résolutions et sont détaillés ci-dessous :

- Le mode **full scan** permet la détection de tous les ions présents dans l'échantillon injecté. Ce mode est aussi appelé courant ionique total (TIC). Il est particulièrement intéressant dans le cas de l'étude des ions fils générés lors de la fragmentation d'un ion parent.

- Le mode **zoom scan** permet de cibler un ion particulier ou un groupe d'ions sur une gamme de m/z restreinte. Il permet de vérifier l'état de charge d'un ion ainsi que sa masse moléculaire. En effet un ion chargé n fois sera séparé de ses isotopes de $1/n$ u.
- Le mode « SIM » pour **single ion monitoring**, permet la sélection d'un ion précis après son entrée dans la trappe.
- Le mode « SRM » de l'anglais **selected reaction monitoring** permet de suivre des fragmentations précises et remarquables d'un ion parent d'intérêt après son isolement dans la trappe.

Le mode « CRM » pour **consecutive reaction monitoring**. Ce mode permet l'observation des ions petits-fils obtenus après fragmentations en chaîne d'un ion parent puis d'un des ions fils générés.

- Les conditions de fragmentation : elles peuvent également être optimisées. En effet, il est nécessaire de contrôler la fenêtre d'isolement des ions afin de sélectionner de façon optimale l'ion parent. Une fenêtre trop grande risque d'entraîner également la fragmentation d'ions de rapport m/z proche de l'ion parent ciblé. L'énergie de collision doit également être réglée afin d'obtenir la meilleure information sur la fragmentation de l'ion parent.

Enfin, le détecteur présent dans le spectromètre de masse basse résolution est une dynode de conversion permettant de détecter les ions positifs ou négatifs selon le mode défini. Un multiplicateur d'électrons permet l'amplification du signal par la formation d'électrons secondaires à l'aide de dynodes (Figure 2-5).

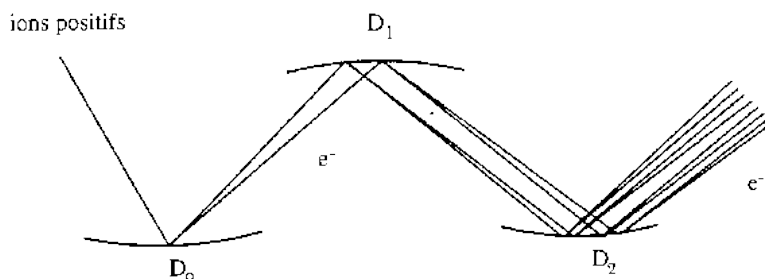


Figure 2-5: Principe du multiplicateur d'électrons (D'après J. Flemen, site web de l'université Rennes 1) (Flemen.J).

Le séquençage des peptaïbols est réalisé par fragmentation multiple (SM^n) sur les mélanges microhétérogènes de peptaïbols. Le voltage de spray, la température du capillaire et le voltage du capillaire sont respectivement de 4,5 kV, 200°C et de 46 V. Le débit de gaz de nébulisation est de 60 unités arbitraires.

3.2. Spectromètre de masse haute résolution

Le spectromètre de masse haute résolution utilisé lors de ces travaux de recherche (Chapitres 3 et 4) est un IT-OaTOF (ion trap and orthogonal acceleration time of flight). Il est composé d'une trappe ionique quadripolaire couplée à un analyseur à temps de vol et est équipé d'une source à électronébulisation (Figure 2-6).

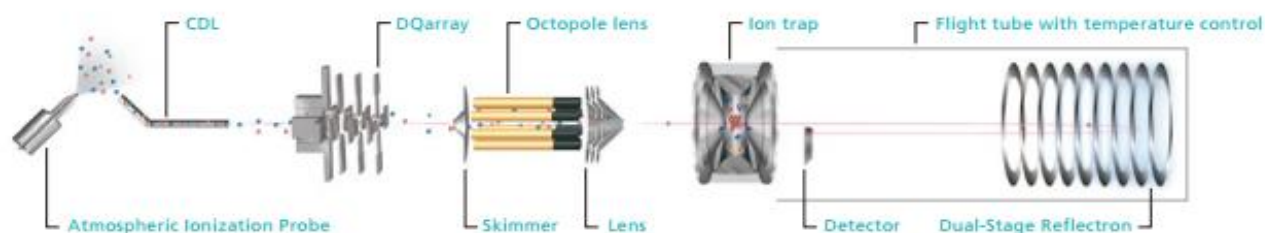


Figure 2-6: Schéma du spectromètre de masse IT-TOF (Schimadzu®)

La source à électronébulisation est légèrement différente de celle du spectromètre de masse basse résolution LCQ, puisqu'elle a une configuration orthogonale. C'est-à-dire, que la sonde portant le capillaire d'entrée du flux injecté est placée à 90° de l'entrée de la source (Figure 2-7).

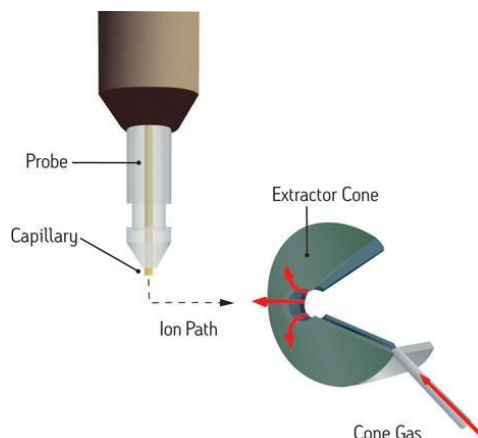


Figure 2-7: Schéma de la configuration orthogonale de la source ESI du spectromètre de masse IT-TOF (d'après le site web de Waters®) (Waters)

Les ions sont ensuite dirigés vers le capillaire chauffé (CDL, Figure 2-6), puis par un ensemble de quadripôles (DQarray) vers l'octopôle qui va agir pour focaliser et conduire les ions dans la trappe ionique (Figure 2-6). Le spectromètre de masse IT-OaTOF combine les technologies existantes du piège à ions quadripolaire et du temps de vol à accélération orthogonale arrangés dans une configuration linéaire (Figure 2-6).

L'analyseur de masse à temps de vol permet l'accélération des ions par un champ électrique de valeur connue. Les ions de même charge acquièrent alors la même énergie cinétique, mais leurs vitesses dépendent du rapport masse/charge (m/z). Le temps mis par une particule chargée pour atteindre un détecteur situé à une distance connue est alors mesuré. Ce temps est fonction de la vitesse et dépend donc du rapport m/z de la particule considérée. Les ions les plus légers seront accélérés aux vitesses les plus hautes. Le rapport m/z correspondant à l'ion découle de ce temps de vol et de la connaissance des autres paramètres expérimentaux comme la position du détecteur et la tension d'accélération (Figure 2-8).

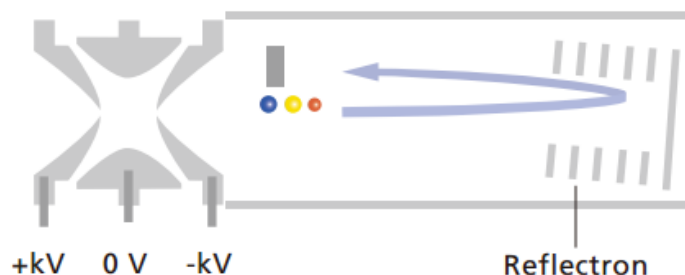


Figure 2-8: Analyseur de masse à trappe ionique couplé à un analyseur de masse temps de vol (Shimadzu®)

Différents paramètres de l'analyseur OaTOF sont ajustables en plus des paramètres de la source, du système de transmission des ions et de l'analyseur trappe ionique précédemment décrits pour le LCQ. L'analyseur OaTOF est constitué d'un réflectron à 2 étapes (dual stage reflectron, Figure 2-6, Figure 2-8). C'est-à-dire 2 champs de retardement à croissance linéaire (un réseau de résistances), séparés par une grille. Le champ de la première section est plus élevé que celui de la deuxième section. Les ions sont donc accélérés avec une tension d'accélération continue de valeur modérée dans un premier temps, puis les ions sont accélérés avec une tension d'accélération pulsée d'amplitude plus importante que la première tension continue. Cette deuxième tension est appliquée de manière perpendiculaire à la trajectoire initiale des ions. Les ions légers arriveront vers le détecteur en tête, et les ions plus lourds ensuite. Les voltages appliqués aux réflectrons sont ajustables. La température du tube d'envol est également contrôlable.

Quant au détecteur, il s'agit d'une galette de microcanaux. C'est un dispositif similaire au photomultiplicateur (dynode) et qui permet l'amplification de charges électriques. La galette céramique polarisée comporte un réseau de microcanaux recouvert d'un dépôt métallique. Lorsqu'une charge entre dans un canal et en percute la paroi, plusieurs électrons sont émis et accélérés par la tension de polarisation. Les électrons ainsi émis vont à leur tour frapper la paroi et générer l'émission d'autres électrons provoquant l'amplification en cascade du signal (Figure 2-9). Le voltage de polarisation appliqué au détecteur peut être modulé, il varie généralement de 1,80 à 2,10 kV.

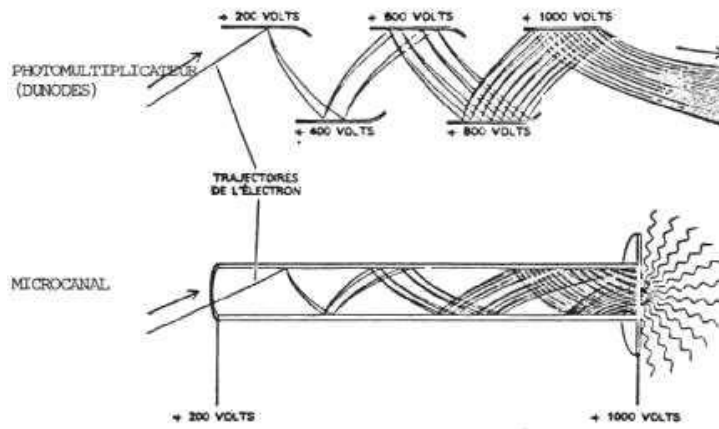


Figure 2-9: Comparaison du fonctionnement du photomultiplicateur (dynode) et de la galette de microcanaux.

Chapitre 3 : Identification de nouvelles séries de peptaïbols/peptaïbiotiques chez des souches marines de *Trichoderma*

1. Contexte

Si la mise en évidence de peptaïbols ayant de nouvelles séquences mais correspondant aux séries déjà connues est relativement courante ((Landreau, 2001; Mohamed-Benkada *et al.*, 2006; Degenkolb *et al.*, 2007; Ruiz, 2007; Ruiz *et al.*, 2007)), la découverte de nouvelles séries de peptaïbiotiques reste par contre beaucoup plus rare. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre introductif bibliographique, de très nombreuses séquences appartenant à des séries variées de peptaïbiotiques, en général et de peptaïbols en particulier, ont déjà été publiées et sont référencées dans la *Comprehensive Peptaibiotics Database* (Stoppacher *et al.*, 2013; Neumann *et al.*, 2015). C'est pourquoi le présent chapitre qui décrit la découverte de deux nouvelles séries, une de peptaïbols à 15 résidus et l'autre de peptaïbiotiques à 17 résidus, constitue une réelle avancée dans le domaine de la connaissance de ces peptides et de leur production par les champignons du genre *Trichoderma*.

Ces deux découvertes résultent du travail effectué dans le cadre de la recherche de souches productrices des principales familles de peptaïbols en vue de purification afin d'effectuer des tests antifongiques (cf. Chapitre 4) et de la recherche de nouveaux peptaïbiotiques bioactifs.

La première est d'autant plus surprenante que les peptaïbols à 15 résidus ont été découverts lors de la purification de témoins de peptaïbols à 14 résidus. La seconde, relative aux peptaïbiotiques à 17 résidus, a directement découlé de l'observation des profils de production des souches de *Trichoderma* sp. de la mycothèque marine du laboratoire. Plusieurs souches de *T. atroviride* présentaient en effet des profils en spectrométrie de masse avec des pics à des valeurs de m/z ne correspondant à aucun peptaïbol connu chez les *Trichoderma* sp.

L'étude de ces nouvelles séries peptidiques est présentée dans ce chapitre.

2. Matériel et Méthodes liés au chapitre

2.1. Cultures, extraction et purification des peptaïbols

La culture, l'extraction et la purification des peptaïbols ont été réalisées selon les protocoles décrits dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

2.2. Séquençage peptidique par spectrométrie de masse

Les séquences peptidiques sont déterminées par l'identification des ions fragments diagnostiques a_n , b_n et y_n classiquement générés lors de la fragmentation peptidique en ionisation positive et négative (cf. Chapitre 2). Les filiations entre les ions fragments diagnostiques et leur ion précurseur sont déterminées permettant l'élaboration de graphes de filiation caractéristiques des séquences microhétérogènes ((Mohamed-Benkada *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2007)).

2.3. Analyse de la composition en acides aminés

Afin de déterminer la composition en acide aminés des séquences peptidiques, et ainsi confirmer leur séquençage par spectrométrie de masse, plusieurs techniques analytiques ont été employées.

2.3.1. Analyses par HPLC-ESI-MS

Une hydrolyse de 5 mg de peptaïbols a été réalisée avec une solution d'acide chlorhydrique à une concentration de 3 mol/L pendant 24h à 110°C. L'hydrolysate a ensuite été séché puis repris dans un mélange de MeOH/H₂O (10:90, v/v). L'hydrolysate et les acides aminés standards ont été analysés par chromatographie liquide sur une colonne kromasil C₁₈ (5 µm, 250 x 2 mm, Interchim, France) couplée au spectromètre de masses à trappe ionique LCQ (couplage HPLC-ESI-IT-MS).

2.3.2. Analyse par HPLC-UV selon le protocole de dérivation de Marfey

Dans un volume de 100 µL d'une fraction contenant 0,5 mg de peptides hydrolysés sont ajoutés 200 µL d'une solution de réactif Marfey, le 1-fluoro-2-4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide (FDAA) dilué à 1% dans l'acétone et 40 µL d'une solution de bicarbonate de sodium à 1 mol/L. Le

mélange est mis à chauffer à 40°C pendant 2h. Après refroidissement, 40 µL d'une solution d'acide chlorhydrique à 1 mol/L sont ajoutés, puis la solution est analysée par HPLC équipée d'une colonne C₁₈ (Kromasil C₁₈, 5 µm 250 x 2 mm) et couplée à un détecteur UV. La phase mobile est un mélange d'eau additionnée d'acide trifluoroacétique à 0,05% et d'acétonitrile (H₂O+TFA 0,05%/ACN). Le gradient d'élution du mélange est donné dans le tableau ci-dessous (Tableau 3-1).

Tableau 3-1 : Gradient utilisé pour la séparation des acides aminés standards dérivés

T (min)	H ₂ O+TFA (0,05%) %	ACN %
0	80	20
20	50	50
25	50	50
30	80	20
35	80	20

2.3.3. Analyses par GC-MS

Une hydrolyse de 5 mg de peptides est réalisée avec une solution d'acide chlorhydrique à une concentration de 3 mol/L pendant 24h à 110°C. L'hydrolysate est ensuite séché puis dérivé en suivant le protocole utilisé au sein du laboratoire « Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnement » du département de pharmacie de l'Université de Rouen. La dérivation consiste à faire réagir 1 mg de l'échantillon hydrolysé avec 200 µL d'isopropanol chlorhydrique 3N pendant 30 min à 100°C avant de l'évaporer à sec, puis de le faire réagir de nouveau avec 200 µL de l'agent dérivant, l'anhydride trifluoroacétique, pendant 30 min à 100°C. Une dernière étape d'évaporation à l'azote, puis une reprise dans du dichlorométhane est nécessaire pour l'analyse des esters *N*-trifluoroacétyl-isopropyliques d'acides aminés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse sur un quadripôle muni d'une source à impact électronique (EI). Le chromatographe utilisé ici est un Agilent 6890 équipé d'un passeur d'échantillons Hewlett-Packard 7673A, d'un système d'introduction « splitless capillary inlet system » et d'une colonne capillaire OPTIMA® 5 MS (5% Diphenyl-95% Dimethylpolysiloxane) (30 m x 0,25 mm diamètre intérieur et 0,25 µm d'épaisseur de film) (Macherey-Nagel, Jülich, Allemagne).

La température du four est maintenue à 50°C pendant 3 min puis une rampe de 3°C/min est appliquée jusqu'à 130°C, puis augmentée un gradient de température de 10°C/min jusqu'à 240°C. Les lignes d'injection et de transfert sont maintenues à une température de 250°C.

2.3.4. Analyses en RMN

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode d'analyse non destructrice qui permet de déterminer la structure d'une molécule via l'énergie propre des liaisons inter-atomes de la molécule. Elle est basée sur la mesure des temps de relaxation des moments magnétiques des noyaux (spin nucléaire) après l'application de 2 champs magnétiques orthogonaux, l'un constant orientant les spins dans une direction et l'autre pulsé désorientant ces spins. La RMN 1D (^1H et ^{13}C) permet de déterminer le nombre de protons et de carbones dans la molécule. L'environnement chimique des noyaux influence les déplacements chimiques observés pour chaque proton (exprimés en partie par million, ppm). L'intégration des pics du spectre proton permet d'en déterminer le nombre de noyaux, tandis que la multiplicité des raies permet de déduire son environnement chimique.

L'analyse des peptides réalisée en RMN 2D du proton et en RMN 2D hétéronucléaire permet de déterminer des corrélations entre les protons et les carbones de différentes parties de la molécule et ainsi d'en déterminer la structure. La RMN 2D du proton met en évidence des interactions dipôle-dipôle à travers l'espace (couplage J) entre des protons appartenant à des résidus voisins. La RMN 2D hétéronucléaire quant à elle permet de mettre en évidence les couplages entre protons et carbone (ou azote) des résidus voisins.

Le travail d'élucidation structurale consiste donc en l'attribution des signaux caractéristiques visibles sur le spectre 1D ^1H et 1D ^{13}C aux différents acides aminés composant le peptide grâce aux techniques de la RMN à deux dimensions (2D), permettant l'étude des corrélations proton-proton et proton-carbone.

Les analyses RMN ont été effectuées par la plateforme PRISM (Université de Rennes) sur un spectromètre RMN 500 MHz équipé d'une crysonde TCI (Bruker®, Massachusetts, USA) (298 K) et au laboratoire Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes

(Muséum National d'Histoire Naturelle) sur un spectromètre RMN 600 MHz (Bruker®, Massachusetts, USA) (298 K). Les échantillons ont été solubilisés dans du méthanol deutéré et du diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO- d_6) respectivement sur l'un et l'autre des spectromètres RMN.

2.3.5. Dérivations chimiques des peptides

2.3.5.1. Estérification par méthanolyse chlorhydrique

La méthanolyse chlorhydrique dans des conditions relativement douces a été réalisée d'après les travaux de Demange (Demange *et al.*, 1990). Une solution de méthanol chlorhydrique à 2 mol/L (500 μ L) est ajoutée à 50 μ L de l'échantillon (5 mg/mL). Le mélange est alors chauffé pendant 30 min à 90°C. Après refroidissement, les composés sont extraits avec 1 mL d'un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (85:15, v/v) puis lavés avec 500 μ L d'eau distillée. La phase inférieure est alors récupérée puis analysée par spectrométrie de masse.

2.3.5.2. Estérification par le méthanol en présence d'acide paratoluene sulfonique (APTS)

La réaction d'estérification par un mélange MeOH/APTS (0,0325 mol/L) a été réalisée dans les conditions décrites par Zambias (Zambias *et al.*, 1995) sur 1 mg d'échantillon. Le mélange est alors chauffé pendant 5 jours à 45°C. Après réaction, les composés sont extraits avec 1 mL d'un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (85:15, v/v) et lavés avec 500 μ L d'eau distillée. La phase inférieure est alors récupérée puis analysée par spectrométrie de masse.

2.3.5.3. Estérification par éthanolyse chlorhydrique

Un volume de 500 μ L d'une solution d'éthanol chlorhydrique à 2 mol.L⁻¹ est ajouté à 50 μ L de l'échantillon (5 mg/mL). Le mélange est chauffé à 90°C pendant 30 min. Après refroidissement, les composés sont extraits avec 1 mL d'un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (85:15, v/v) et lavés avec 500 μ L d'eau distillée. La phase inférieure est alors récupérée puis analysée par spectrométrie de masse.

2.3.5.4. Acétalisation des fonctions cétones par l'éthylène glycol

Un volume de 500 μ L d'une solution d'éthylène glycol chlorhydrique à 2 mol.L⁻¹ a été ajouté à 50 μ L de l'échantillon (5 mg/mL). Le mélange est alors chauffé à 90°C pendant 30 min. Après

refroidissement, les composés sont extraits avec 1 mL d'un mélange de CH₂Cl₂/MeOH (85:15, v/v) et lavés avec 500 µL d'eau distillée. La phase inférieure est alors récupérée puis analysée par spectrométrie de masse.

3. Peptaïbols à 15 résidus produits par des souches de *Trichoderma harzianum*

3.1. Contexte de l'étude

Afin de mener à bien l'étude de l'activité antifongique des peptaïbols, nous avons recherché des souches dont les profils de production faisaient apparaître une majorité d'une des séries recherchées. Pour la purification des peptaïbols à 14 résidus, nous avons choisi la souche MMS 1255, alors identifiée *T. harzianum*, pour laquelle les peptaïbols à 14 résidus apparaissaient nettement majoritaires dans l'extrait enrichi (VLC, fraction CH₂Cl₂/EtOH 90:10, v/v) avec peu de peptaïbols à 11 résidus et pas de peptaïbols longs (en particulier ceux à 18 résidus rencontrés chez les autres *T. harzianum*) (Figure 3-1).

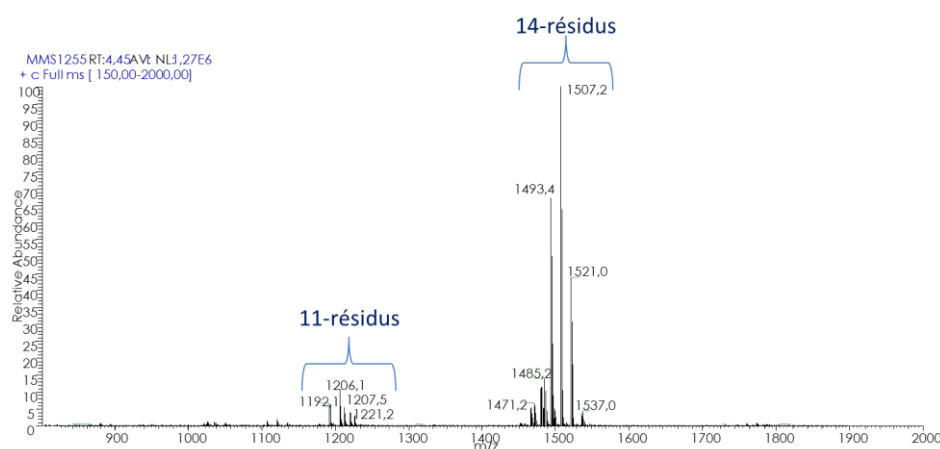


Figure 3-1 : Profil MS de l'extrait enrichi en peptaïbols de la souche MMS 1255

Le grossissement en mode *Zoomscan* de la zone des *m/z* des peptaïbols à 14 résidus révèle cependant une particularité (Figure 3-2).

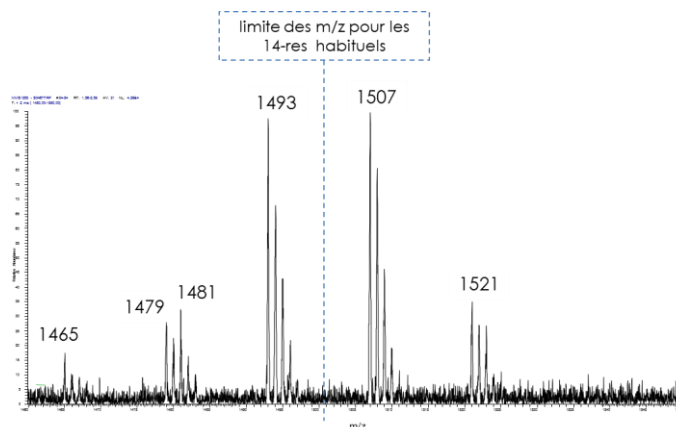


Figure 3-2 : Zoomscan de la zone des 14 résidus (m/z 1465 à 1521) de la souche MMS 1255

En effet les peptaïbols « classiques » à 14 résidus produits par les *Trichoderma* répondent à la séquence générale :

Ac-Aib-Asn/Gln-Vxx/Lxx-Aib-Pro-Vxx-Vxx/Lxx-Aib-Pro-Aib/Vxx-Lxx-Aib-Pro-LxxOH.

Selon ce modèle, si l'on prend la séquence la plus « lourde » c'est-à-dire celle contenant la Gln à la place de l'Asn, des Lxx à la place des Vxx et un Vxx en position 10, le m/z de l'ion $[M+Na]^+$ correspondant est de 1493. La présence d'ions de m/z supérieurs, c'est-à-dire 1507 et 1521, séparés du 1493 respectivement par 14 et 28, pouvaient faire penser à la présence de peptaïbols à 14 résidus originaux avec en particulier des remplacements supplémentaires d'Aib par des Vxx ou de Vxx par des Lxx, ce qui n'avait encore jamais été observé. Un des avantages d'une analyse réalisée avec un spectromètre de masse à trappe d'ions est de pouvoir étudier et fragmenter les ions présents dans un mélange sans avoir besoin de purifier les molécules au préalable. L'analyse en vue d'un séquençage fut donc conduite sur les pics supplémentaires et le résultat fut des plus surprenants. En effet, il ne s'agissait pas de nouveaux membres de la série des peptaïbols à 14 résidus ayant incorporé des acides aminés plus lourds, mais bien d'une nouvelle série de peptaïbols encore jamais observée dans des extraits de *Trichoderma* : des peptaïbols à 15 résidus d'acides aminés.

Afin de confirmer ces résultats prometteurs, une production en quantité suffisante des peptides de cette nouvelle série a été entreprise.

3.2. Production et isolement

Après l'arrêt des cultures et application du protocole d'extraction, 2,8 g d'extract brut ont été obtenus à partir de 35 boîtes de Petri (15 cm de diamètre). L'extract brut a été premièrement fractionné par chromatographie liquide sous vide (VLC) avec un mélange CH₂Cl₂/EtOH de polarité croissante (98: 2 à 85:15, v/v). Après contrôle par spectrométrie de masse, les fractions 95:5 ; 92:8 ; 90:10 et 85:15, toutes enrichies en peptaïbols à 15 résidus, ont été regroupées pour donner la fraction 2 (940 mg).

La fraction 2 a alors été fractionnée à son tour par chromatographie liquide sur colonne ouverte de gel de silice avec un gradient discontinu CH₂Cl₂/MeOH de polarité croissante (100:0 à 80:20, v/v). Seize fractions, nommées 2-1 à 2-16, ont été récoltées, révélées par CCM et analysées par spectrométrie de masse. Le bilan massique de cette étape de fractionnement est présenté dans le Tableau 3-2.

Tableau 3-2 : Bilan massique du fractionnement de la fraction 2 par chromatographie liquide sur colonne ouverte de gel de silice

Fraction	Solvant d'élution	
	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (v/v)	Masse (mg)
2-1	100:0	38
2-2	95:5	21
2-3	92:8	8
2-4	90:10	10
2-5*	88:12	6
2-6*	88:12	13
2-7*	85:15	21
2-8*	85:15	108
2-9	85:15	99
2-10	85:15	433
2-11	85:15	7
2-12	85:15 → 80:20	31
2-13	80:20	7
2-14	80:20	5
2-15	80:20	10
2-16	80:20	14
Total		831
Fraction 2		940
Rendement		88%
*Présence de peptaïbols à 11 et 14 résidus		

Les peptides d'intérêt ont été élués principalement dans les fractions 2-9 et 2-10, représentant à elles seules plus de 50 % de l'extrait déposé et sont en mélange microhétérogène.

Il est important de noter que lors de l'analyse des fractions par spectrométrie de masse, certaines d'entre-elles comme les fractions 2-5, 2-6, 2-7 et 2-8 étaient enrichies en peptaïbols à 11 et 14 résidus. Après séquençage, il s'agissait de peptaïbols classiquement produits par les *Trichoderma* et l'espèce *harzianum*. Les séquences obtenues sont présentées ci-dessous (Tableau 3-3).

Tableau 3-3 : Séquences observées des peptaïbols à 11 et 14 résidus produits par *T. harzianum* MMS 1255

Peptaïbols à 11 résidus											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ac	U	Q	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol
Vx											

Peptaïbols à 14 résidus														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ac	U	Q	Lx	U	P	A	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol
Vx						S								

La fraction 2-7 a d'ailleurs été purifiée afin d'obtenir un mélange microhétérogène de peptaïbols à 14 résidus qui a été testé sur les champignons phytopathogènes (cf. Chapitre 4).

Un aliquot d'une quarantaine de milligrammes de la fraction 2-10 a été purifié par HPLC semi-préparative en phase inverse (C₁₈) afin de séparer les différents peptaïbols présents en mélange microhétérogène. Quatorze fractions ont été récoltées (2-10-1 à 2-10-14) de 20,5 à 80 minutes d'élution (Figure 3-3).

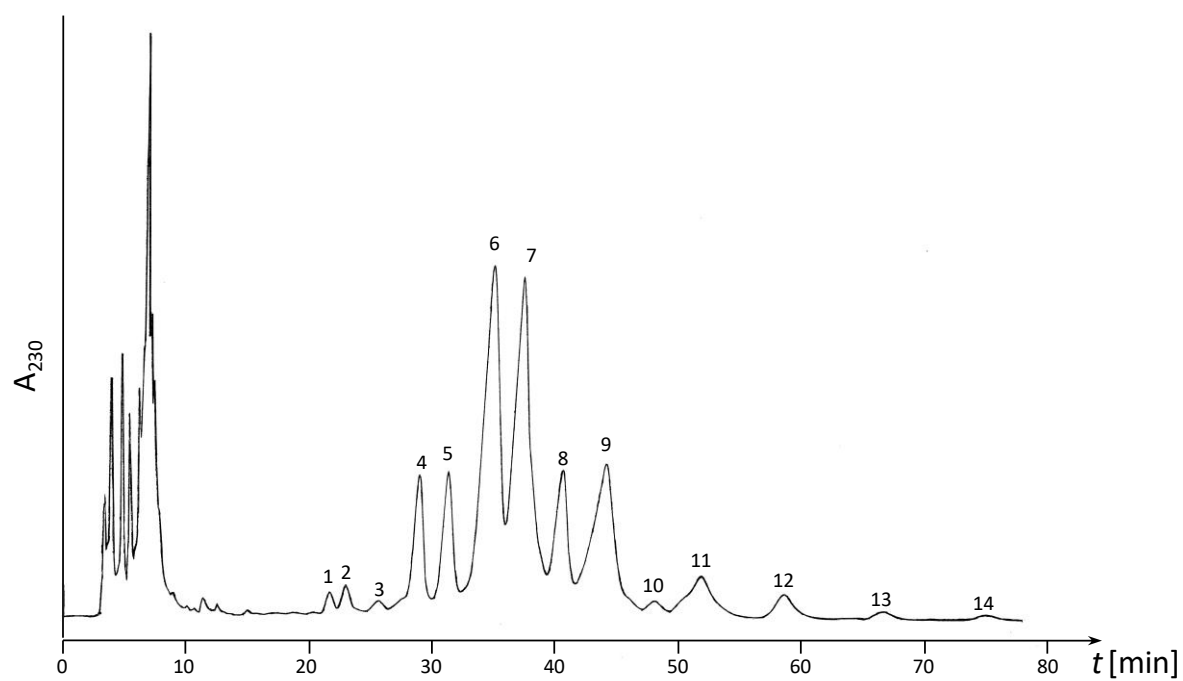


Figure 3-3 : Chromatogramme HPLC-UV (230 nm) de la fraction 2-10

Le bilan massique de l'étape HPLC préparative est présenté Tableau 3-4.

Tableau 3-4 : bilan massique de l'étape de purification par HPLC de la fraction 2-10

Fraction	Masse (mg)
2-10-1	0,2
2-10-2	0,1
2-10-3	0,3
2-10-4	1,8
2-10-5	2,2
2-10-6	7,2
2-10-7	7,3
2-10-8	1,2
2-10-9	4,1
2-10-10	0,1
2-10-11	0,6
2-10-12	0,1
2-10-13	0,1
2-10-14	0,7
Total	32,9
Fraction 2-10	44,4
Rendement	60 %

Le rendement de l'étape de purification est de 60 %. Il s'explique principalement par le fait que la fraction récoltée en début d'élution représentait une proportion non négligeable d'impureté (6,9 mg). Après analyses MS, les peptaïbols ont été élués des fractions HPLC 2-10-2 à 2-10-13 avec deux fractions majoritaires : 2-10-6 et 2-10-7. Le Tableau 3-5 résume les différents ions des trois séries de peptaïbols observés dans chacune des fractions HPLC obtenues.

Tableau 3-5 : Résultats de l'étape de purification par HPLC de la fraction 2-10

Séries	$[M+2Na]^{2+}$	$[M+Na]^+$	Fractions CLHP 2-10-													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
14 résidus	743,9	1464,8														
	750,9	1478,8														
15 résidus	750,9	1478,8														
	757,9	1492,8														
	764,9	1506,8														
	771,9	1520,8														
	778,9	1534,8														

Les fractions 2-10-4 à 2-10-8 correspondent à des fractions purifiées en peptaïbols avec pour chacune d'entre-elles un seul ion moléculaire observé m/z $[M+Na]^+$ compris entre 1478,8 et 1506,8. En revanche, à partir de la fraction 2-10-9, les peptaïbols sont présents en mélange avec au moins deux ions observés (1506,8 et 1520,8 par exemple). Les fractions 2-10-2 et 2-10-3

correspondent aux peptaïbols à 14 résidus déjà décrits précédemment et dont l'ion m/z 1478,8 peut être confondu avec celui des peptaïbols à 15 résidus.

La Figure 3-4 reprend les étapes séparatives successives qui ont permis d'obtenir les peptaïbols des différentes séries par fractionnement chromatographique de l'extrait brut.

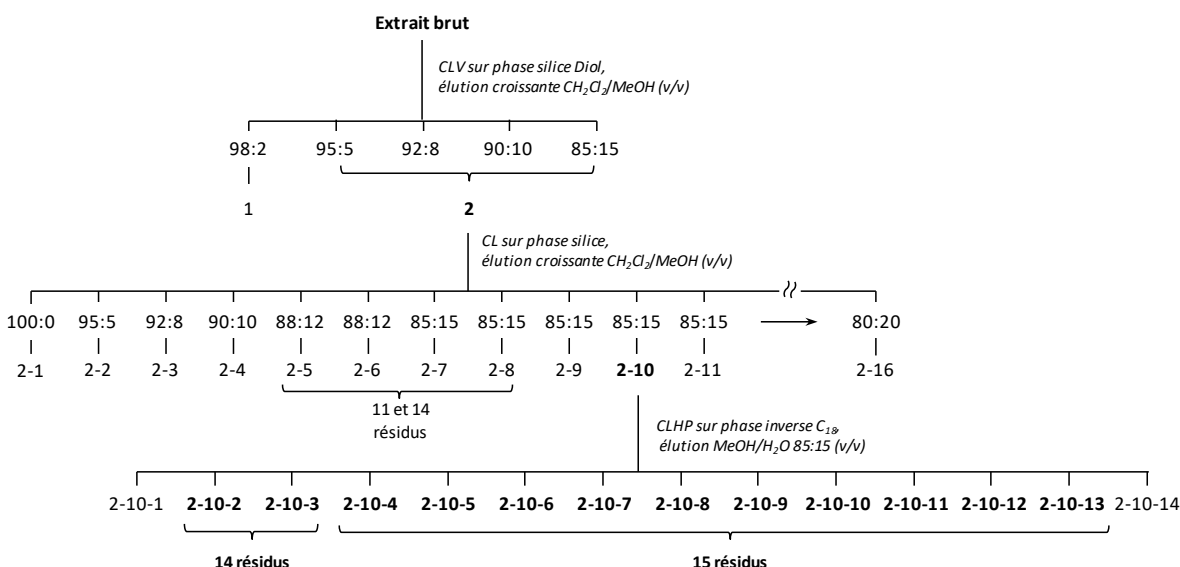


Figure 3-4 : Synthèse des étapes de purification des peptaïbols produits par *T. harzianum* MMS 1255

Chaque ion observé dans les fractions contenant les peptaïbols à 15 résidus a ensuite été séquencé par spectrométrie de masse.

3.3. Identification structurale des peptaïbols à 15 résidus

3.3.6. Analyse séquentielle par spectrométrie de masse

Le séquençage de ces peptides a été réalisé par fragmentation MS^2 sur les ions moléculaires $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et $[\text{M}-\text{H}]^-$ produits respectivement en mode d'ionisation positive et négative en conditions neutres. Pour illustrer ce travail de séquençage, le peptide élué dans l'une des deux fractions majoritaires (fraction HPLC 2-10-6) et présent sous la forme d'adduit $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1492,8 a été pris comme exemple (Figure 3-5).

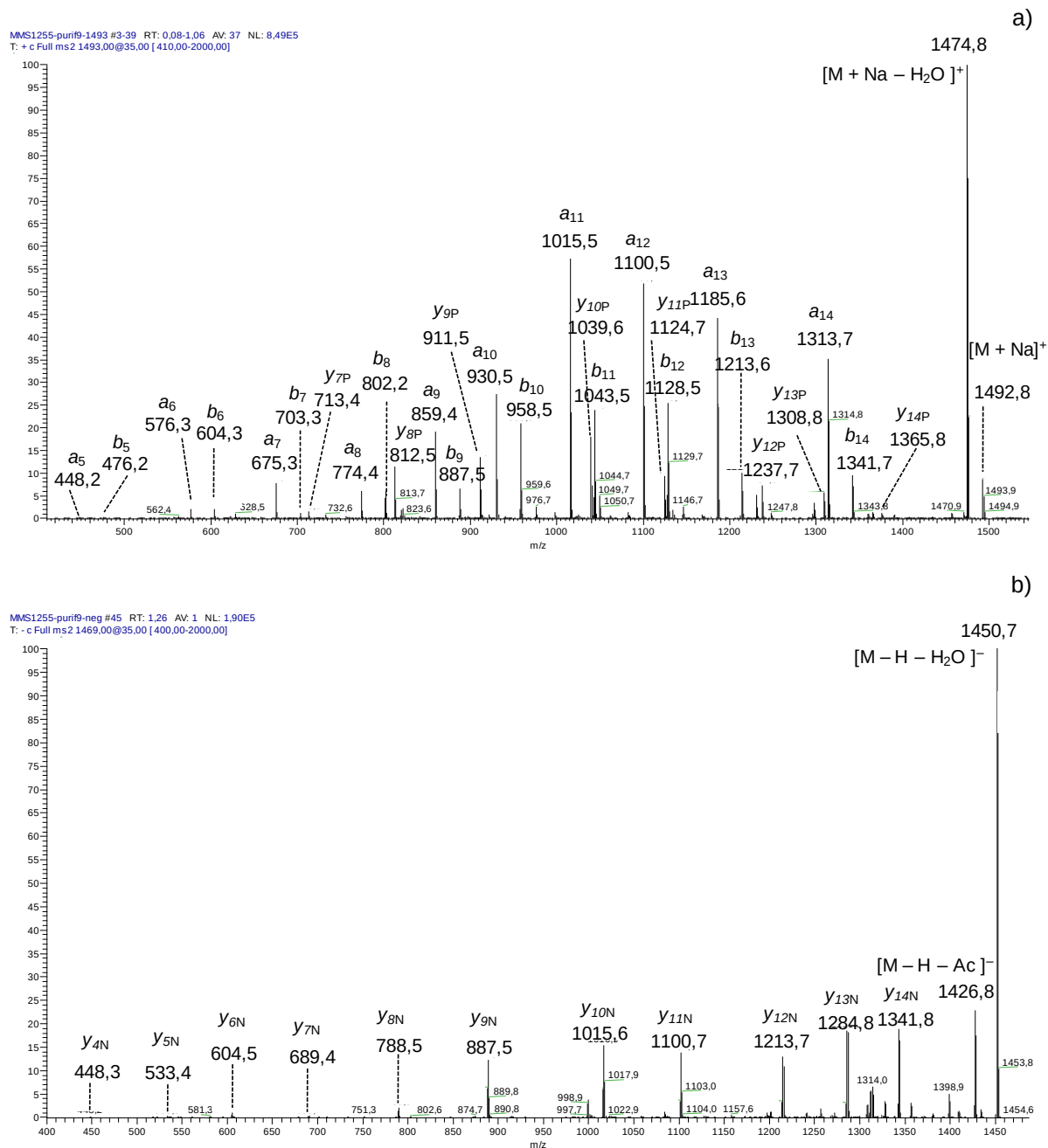


Figure 3-5 : Séquençage du peptide élué dans la fraction HPLC 2-10-6. a) Spectre MS^2 de l'ion $[M + Na]^+$ m/z 1492,8 en ionisation positive ; b) Spectre MS^2 de l'ion $[M - H]^-$ m/z 1468,8 en ionisation négative

Suite à l'application d'une énergie de collision sur l'ion moléculaire, la fragmentation MS^2 génère principalement l'ion $[M+Na-H_2O]$ ainsi qu'une série d'ions fragments C-terminaux $[b_n+Na-H]^+$ et $[a_n+Na-H]^+$ qui se succèdent à chaque perte de résidus (Figure 3-5, a). Chaque couple d'ions fragments b_n/a_n générés est facilement identifiable sur le spectre de masse par

une différence de 28 (C=O), correspondant à la coupure au niveau de la liaison peptidique (ion b) ou après (ion a). Contrairement aux peptaïbols classiques, ces nouveaux peptides ne présentent pas de motif Aib-Pro dans leur séquence. Cela se traduit par l'absence d'ions fragments très abondants normalement observés et générés par la coupure préférentielle entre l'Aib et la Pro. Les deux premiers ions fragments b et a observés (m/z 1341,7 et 1313,7) correspondent respectivement à une perte de masse de 151 et 179 (151+28). Ce premier résidu, d'une masse moléculaire de 150 Da correspond au Pheol, amino-alcool souvent observé chez les peptaïbols longs du genre *Trichoderma*. En poursuivant l'assignation des couples d'ions b/a (1213,6/1185,6 ; 1128,5/1100,5 ; 1043,5/1015,5 etc.), une partie de la séquence peut être déterminée à partir de l'extrémité C-terminale : [476]-Gln -Vxx-Vxx-Aib-Ala-Aib-Aib-Aib-Gln-Pheol.

Par déduction à partir des ions b, il est alors possible de rechercher la présence de certains ions fragments N-terminaux $[y_{nP}+Na+H]^+$ qui sont également produits par fragmentation en mode positif. Ainsi, les ions m/z 1365,8 ; 1308,8 ; 1237,7 ; 1039,6 ; 911,5 ; etc. peuvent être assignés à des ions N-terminaux. Les différences de masse entre chacun d'eux permettent de déterminer la séquence d'acides aminés à partir de l'extrémité N-terminale : [127]-Gly-Ala-Lxx-Aib-Gln-Vxx-Vxx-[713]. Ainsi, la séquence quasiment complète peut être déduite uniquement par l'analyse du spectre MS^2 obtenu en mode positif : [127]-Gly-Ala-Lxx-Aib-Gln-Vxx-Vxx-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Pheol. Le résidu N-terminal correspondant à une masse de 127 peut correspondre à l'Aib N-terminal acétylé (85+42).

Afin de confirmer l'assignation des ions N-terminaux et le séquençage N-terminal, les ions y_{nN} générés par fragmentation de l'ion $[M-H]^-$ en ionisation négative sont alors recherchés (Figure 3-5, b). La fragmentation MS^2 génère principalement l'ion $[M-H-H_2O]^-$ ainsi qu'une série d'ions fragments N-terminaux y_{nN} qui se succèdent à chaque perte de résidus. Contrairement à la fragmentation en mode positif, ici l'ion fragment est caractéristique de la perte du groupement N-Acétyle et facilement observé, confirmant ainsi l'acétylation de l'Aib N-terminal. Ce séquençage en mode négatif permet ainsi de proposer la séquence N-terminale suivante : Ac-Aib-Gly-Ala-Lxx-Aib-Gln-Vxx-Vxx-Aib-Ala-Aib-[448].



Cette même démarche a été appliquée à tous les peptides de cette nouvelle série (fractions HPLC 2-10-4 à 2-10-13). Les séquences identifiées sont présentées dans le Tableau 3-6 et les résultats du séquençage compilant les ions fragments diagnostiques figurent en Annexe (Tableau A1-1).

Tableau 3-6 : Séquences des peptaïbols à 15 résidus produits par *Trichoderma harzianum* MMS1255

Fraction CLHP	[M+Na] ⁺ m/z	[M+2Na] ²⁺ m/z	PM (Da)	Position															Peptide	Formule brute
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
2-10-4	1478,8	750,9	1455,8	AcU	G	A	Lx	U	Q	U	Vx	U	A	U	U	U	Q	Fol	TH-15-I	C ₆₈ H ₁₁₃ N ₁₇ O ₁₈
2-10-5	1492,8	757,9	1469,8	AcU	G	A	Lx	U	Q	U	Lx	U	A	U	U	U	Q	Fol	TH-15-IIa	C ₆₉ H ₁₁₅ N ₁₇ O ₁₈
2-10-6	1492,8	757,9	1469,8	AcU	G	A	Lx	U	Q	Vx	Vx	U	A	U	U	U	Q	Fol	TH-15-IIb	C ₆₉ H ₁₁₅ N ₁₇ O ₁₈
2-10-7	1506,8	764,9	1483,8	AcU	G	A	Lx	U	Q	Vx	Lx	U	A	U	U	U	Q	Fol	TH-15-IIIa	C ₇₀ H ₁₁₇ N ₁₇ O ₁₈
2-10-8	1506,8	764,9	1483,8	AcU	G	A	Lx	Vx	Q	Vx	Vx	U	A	U	U	U	Q	Fol	TH-15-IIIb	C ₇₀ H ₁₁₇ N ₁₇ O ₁₈
2-10-9	1506,8	764,9	1483,8	AcU	G	A	Lx	U	Q	Vx	Lx	U	A	U	U	U	Q	Fol	TH-15-IIIc	C ₇₀ H ₁₁₇ N ₁₇ O ₁₈
	1520,8	771,9	1497,8	AcU	G	A	Lx	Vx	Q	Vx	Lx	U	A	U	U	U	Q	Fol	TH-15-IVa	C ₇₁ H ₁₁₉ N ₁₇ O ₁₈
2-10-10	1520,8	771,9	1497,8	AcU	G	A	Lx	Vx	Q	Vx	Lx	U	A	U	U	U	Q	Fol	TH-15-IVa	C ₇₁ H ₁₁₉ N ₁₇ O ₁₈
	1520,8	771,9	1497,8	AcU	G	A	Lx	U	Q	Vx	Lx	U	A	Vx	U	U	Q	Fol	TH-15-IVb	C ₇₁ H ₁₁₉ N ₁₇ O ₁₈
	1534,8	778,9	1511,8	AcU	G	A	Lx	Vx	Q	Vx	Lx	U	A	Vx	U	U	Q	Fol	TH-15-Va	C ₇₂ H ₁₂₁ N ₁₇ O ₁₈
	1534,8	778,9	1511,8	AcU	A	A	Lx	Vx	Q	Vx	Lx	U	A	U	U	U	Q	Fol	TH-15-Vb	C ₇₂ H ₁₂₁ N ₁₇ O ₁₈
2-10-11	1520,8	771,9	1497,8	AcU	G	A	Lx	Vx	Q	Vx	Lx	U	A	U	U	U	Q	Fol	TH-15-IVa	C ₇₁ H ₁₁₉ N ₁₇ O ₁₈
	1534,8	778,9	1511,8	AcU	G	A	Lx	Vx	Q	Vx	Lx	U	A	Vx	U	U	Q	Fol	TH-15-Va	C ₇₂ H ₁₂₁ N ₁₇ O ₁₈
2-10-12	1520,8	771,9	1497,8	AcU	G	A	Lx	Vx	Q	Vx	Lx	U	A	U	U	U	Q	Fol	TH-15-IVa	C ₇₁ H ₁₁₉ N ₁₇ O ₁₈
	1520,8	771,9	1497,8	AcU	G	A	Lx	U	Q	Vx	Lx	U	A	Vx	U	U	Q	Fol	TH-15-IVb	C ₇₁ H ₁₁₉ N ₁₇ O ₁₈
	1534,8	778,9	1511,8	AcU	G	A	Lx	Vx	Q	Vx	Lx	U	A	Vx	U	U	Q	Fol	TH-15-Va	C ₇₂ H ₁₂₁ N ₁₇ O ₁₈

Seize séquences peptidiques ont pu être identifiées et ont été nommées TH-15-I à TH-15-Va. TH correspond à l'abréviation de *Trichoderma harzianum* et 15 au nombre de résidus. Les chiffres romains I à V correspondent aux différentes masses moléculaires observées, de 1455 à 1511 Da. Les séquences microhétérogènes de masses moléculaires identiques ont été différenciées par l'annotation d'une lettre en minuscule (a, b, c).

Ces résultats de séquençage confirment que les fractions 2-10-4 à 2-10-8 correspondent à des peptides purs (TH-15-I, -IIa, -IIb, -IIIa et -IIIb). L'analyse structurale de ces peptides a donc été complétée par une analyse des acides aminés constitutifs après hydrolyse et dérivation au réactif de Marfey et pour les deux peptides majoritaires (TH-15-IIb et TH-15-IIIa) par une analyse en RMN. En revanche, ces analyses n'ont pas été effectuées pour les autres fractions, constituées de mélange microhétérogène de peptaïbols.

3.3.7. Analyse des acides aminés constitutifs

3.3.7.1. Analyses RMN

Les deux peptaïbols majoritaires TH-15-IIb et TH-15-IIIa ont été analysés en RMN afin de déterminer la présence des isomères d'acides aminés Val/Iva et Leu/Ile aux positions 4, 7 et 8. Les déplacements chimiques des protons et des carbones pour ces deux peptaïbols sont compilés en Annexe 1, Tableau A1-2 et A1-3. L'exemple de l'élucidation structurale de la séquence TH-15-IIb (m/z 1492,8, Tableau 3-6) est pris ici pour l'illustration de l'analyse. Le spectre 1D ^1H obtenu pour la séquence TH-15-IIIb est présenté dans la Figure 3-7.

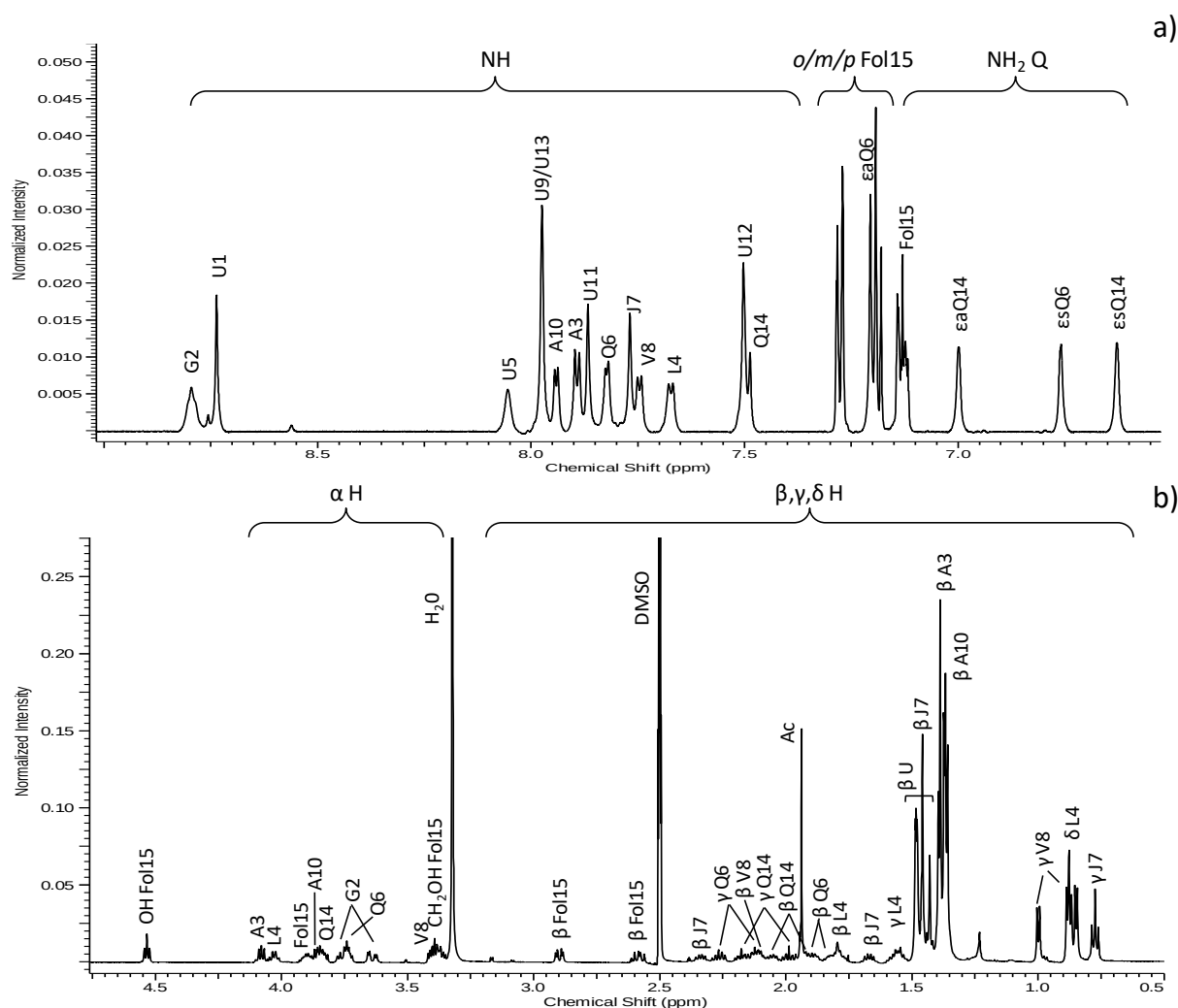


Figure 3-7 : Spectre de RMN 1D ^1H de la séquence TH-15-IIb (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 298K), a) région des protons amides (9 – 6,5 ppm) ; b) région des protons α , β , γ , δ (4,8 – 0,5 ppm)

Plusieurs régions sont visibles sur le spectre, qui peut être découpé en trois grandes zones :

- La région des protons de la liaison amide entre 6,5 et 9 ppm (Figure 3-7, a), où les protons de la liaison NH appartenant aux acides aminés α,α -dialkylés (Aib et Iva) apparaissent sous forme de singulets. Les protons aromatiques appartenant au résidu C-terminal (Pheol) sont visibles autour de 7,1 ppm. Vers 8,8 ppm, les protons NH de la Gly sortent sous forme d'un triplet caractéristique. Les protons amides *syn* (6,7 et 6,6 ppm pour Gln₆ et Gln₁₄ respectivement) et *anti* (7,2 et 7,0 ppm pour Gln₆ et Gln₁₄ respectivement) des 2 Gln apparaissent également sous forme de singulets élargis dans cette région, les *anti* étant plus déblindés.
- La région des protons α ainsi que des protons β CH₂OH du Pheol C-terminal se situe entre 3,3 et 4,7 ppm (Figure 3-7, b).
- La région des protons β et γ des chaînes latérales ainsi que de ceux appartenant aux groupements méthyles apparaît entre 0,5 et 3,3 ppm (Figure 3-7, b). Le proton α du méthyle du groupe acétyle N-terminal correspond à un singulet caractéristique vers 1,9 ppm. Un deuxième signal remarquable dans cette zone est celui du proton γ du méthyle d'une Iva, caractérisé par un triplet vers 0,76 ppm. Un doublet vers 1,0 ppm signe également la présence du proton γ du méthyle d'une Val. Ainsi, l'analyse du spectre 1D ¹H permet de mettre en évidence la présence à la fois des isomères Val et Iva dans la séquence peptidique. En revanche, la détermination de l'isomère Leu/Ile ne peut pas se faire par les valeurs des déplacements chimiques des protons β et γ . Sa forme isomérique est donc déterminée par la valeur du déplacement chimique de son carbone α .

Les couplages directs proton-proton ont ensuite permis de déterminer l'ensemble des protons des chaînes latérales des acides aminés grâce à l'étude des spectres RMN 2D-COSY (CORrelationSpectrometrY) et 2D-TOCSY (TOtal Correlated SpectroscopY) (Annexe1, Figure A1-1 et A1-2). La séquence d'impulsion ¹H-¹H COSY met en évidence les couplages scalaires (²J_{HH} ou ³J_{HH} protons portés par les carbones voisins) alors que la séquence d'impulsion 2D-TOCSY met en évidence tous les couplages scalaires d'un système de spin (J_{HH}). Les protons ont alors pu être

corrélés entre eux afin de les attribuer à leurs acides aminés respectifs. Dans le même temps, l'étude du spectre RMN ^{13}C de la séquence TH-15-IIb a permis de repérer les carbones quaternaires et les CH_2 . De plus, la détermination de l'isomère Leu/Ile est basée sur la valeur du déplacement chimique de son carbone. En effet, en général le carbone α d'une isoleucine (60-63 ppm) est plus déblindé que celui de son isomère leucine (53-56 ppm). Dans le cas de la séquence TH-15-IIb, une raie est visible à 54,1 ppm, indiquant qu'il s'agit d'une Leu (Annexe 1, Figure A1-4). Le résidu Lxx déterminé en position 4 suite à la fragmentation MS a donc pu être attribué à une Leu. Afin d'assigner la position des résidus Val et Iva dans la séquence (deux Vxx aux positions 7 et 8, d'après le séquençage par MS), les analyses des corrélations proton-carbone ont alors été effectuées. Pour cela, une acquisition HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) mettant en évidence les interactions ^1H - ^{13}C (couplage directs $^1J_{\text{CH}}$) (Annexe 1, Figure A1-3) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) permettant de visualiser les interactions à longue distance ^1H - ^{13}C (couplage directs $^2J_{\text{CH}}$ et $^3J_{\text{CH}}$ voire $^4J_{\text{CH}}$) ont été réalisées. Un agrandissement du spectre 2D HMBC est présenté Figure 3-8.

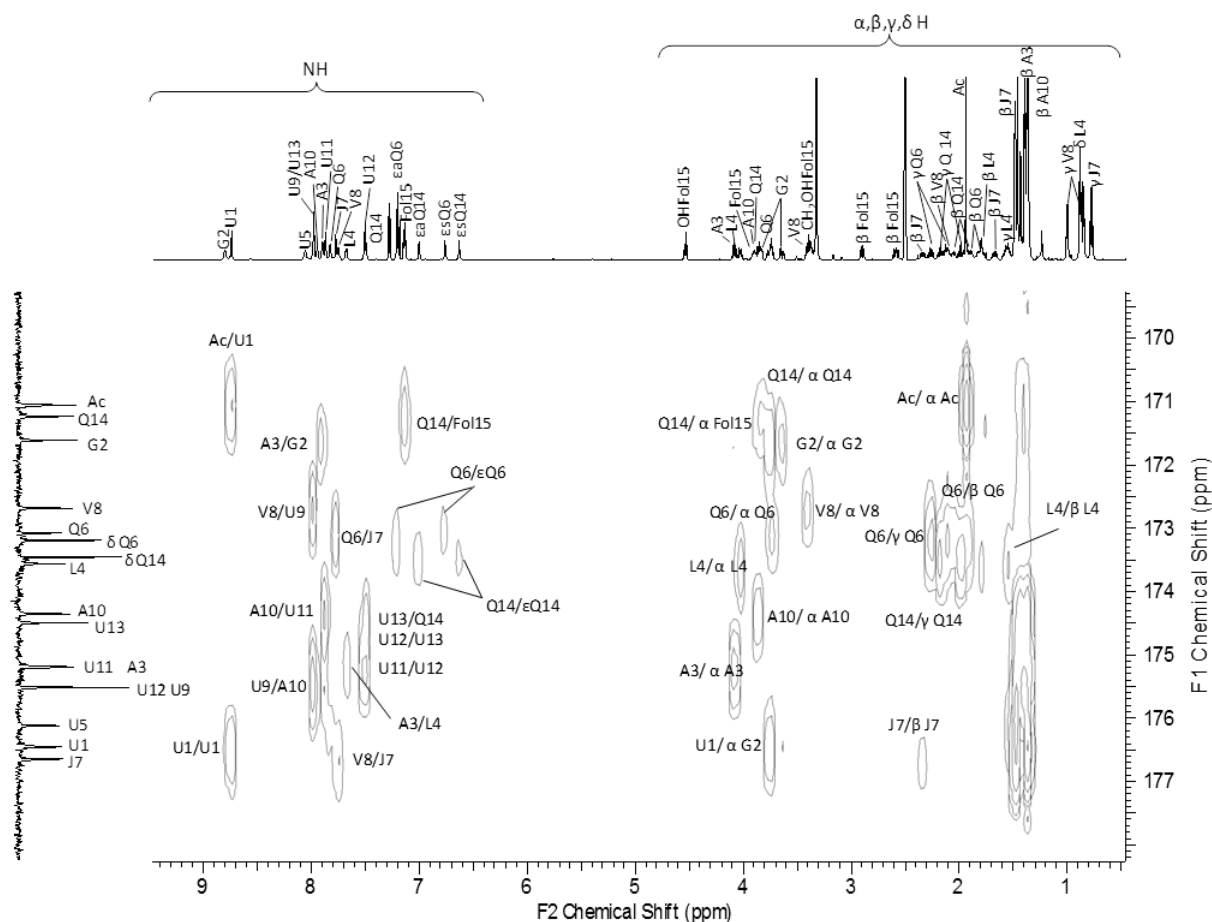


Figure 3-8 : Spectre 2D-HMBC de la séquence TH-15-IIb. Agrandissement de la région des carbonyles 180-170 ppm (600 MHz, DMSO- d_6 , 298K)

L'assignement séquentiel des groupes carbonyles du peptide a été obtenu par l'étude des couplages $^2J_{\text{CO,NH}}$ et $^3J_{\text{CO,H}\beta}$. Leurs valeurs de déplacements chimiques sont compilées en Annexe 1, Tableau A1-2. Les corrélations entre les protons assignés à chaque acide aminé et les carbones des carbonyles de la chaîne peptidique ont été étudiées. Chacun des protons amides a pu être corrélé au carbone des carbonyles de l'acide aminé le précédant dans l'enchaînement peptidique. Il est intéressant de noter que les signaux ^{13}CO des Aib et de l'Iva sont plus déblindés (174,5-176,6 ppm) que ceux des acides aminés monoalkylés (171,2-174,3 ppm). Le carbone du carbonyle de l'acétyle (171,0 ppm) et corrélé avec un singulet NH à 8,73 ppm appartenant à un Aib. Il s'agit donc du premier résidu de ce peptaïbol, l'Aib en position 1 N-acétylé. Cette analyse a permis d'assigner l'Iva et la Val aux positions 7 et 8 respectivement. Cette analyse a été complétée par l'observation des corrélations entre les

carbonyles et les protons α , β , γ et δ de la chaîne latérale des acides aminés. L'enchaînement peptidique a également pu être complété par l'étude des corrélations NOESY, qui a permis dans certains cas de mettre en évidence les interactions dipolaires entre les protons amides de deux résidus contigus (d NN (i, i+1)) (Figure 3-9).

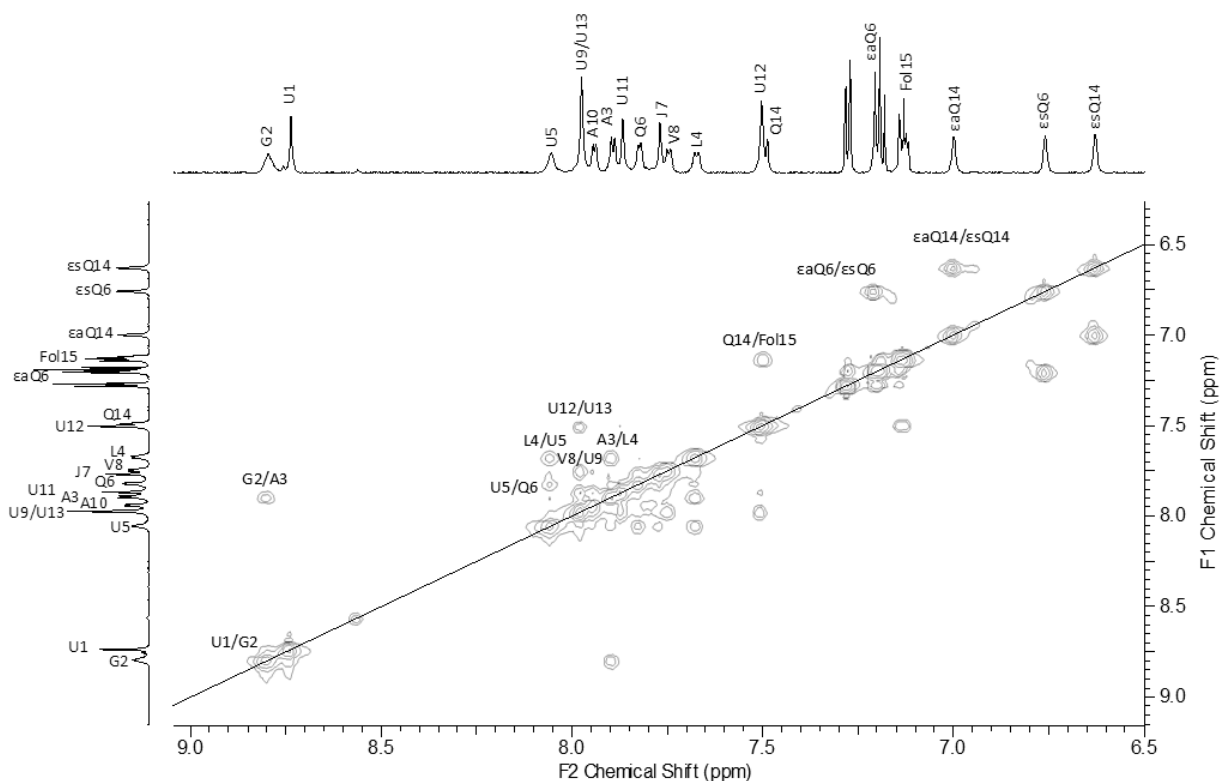


Figure 3-9 : Spectre 2D-NOESY de la séquence TH-15-IIb. Agrandissement de la région des protons amides 9-6,5 ppm (600 MHz, DMSO- d_6 , 298K)

L'analyse des corrélations NOESY a permis ainsi de compléter les attributions séquentielles et de confirmer les segments Aib₁-Gln₆, Val₈-Aib₉, Aib₁₂-Aib₁₃ et Gln₁₄-Pheol₁₅. La structure de la séquence TH-15-IIb déterminée à la suite de ce travail ainsi que les corrélations HMBC et NOESY observées sont présentées ci-dessous (Figure 3-10).

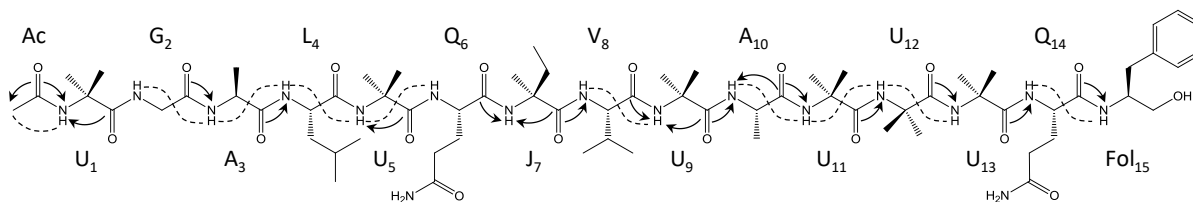


Figure 3-10 : Structure du peptaïbol TH-15-IIb avec les corrélations HMBC (→) et NOESY (---)

Les analyses en RMN réalisées sur ce peptide ont ainsi permis d'une part de confirmer le séquençage obtenu précédemment par MS et d'autre part d'identifier les acides aminés isomères Vxx et Lxx présents en position 4, 7 et 8. La même méthodologie a été appliquée pour l'analyse du peptide TH-15-IIIa. Les analyses ont confirmé la présence des résidus Leu₄ et Iva₇, comme c'était le cas pour la séquence précédente, et ont mis en évidence la présence d'une Leu₈ à la place de la Val₈. Les spectres de RMN relatifs au peptaïbol TH-15-IIIa sont compilés en Annexe 1.

Ces analyses RMN ont ainsi permis de confirmer les séquences déterminées par spectrométrie de masse mais également d'attribuer les acides aminés Val/Iva et Leu aux positions incertaines pour les deux peptaïbols majoritaires. En parallèle à cette étude, les acides aminés constitutifs des 5 peptaïbols présents sous forme purifiée (TH-15-I, IIa, IIb, IIIa et IIIb) ont été analysés par HPLC-UV, après hydrolyse et dérivation par le réactif Marfey. Cette étude a deux objectifs : d'une part déterminer les isomères Vxx et Lxx pour les 3 peptaïbols minoritaires n'ayant pas été analysés par RMN et d'autre part d'apporter une information supplémentaire sur la chiralité des acides aminés constitutifs de ces peptides.

3.3.7.2. Analyse des acides aminés après dérivation Marfey

Les standards d'acides aminés de configuration dextrogyre (*D*) et lévogyre (*L*) susceptibles de rentrer dans la composition des peptaïbols à 15 résidus ont été dérivés par le réactif Marfey (FDAA) et injectés individuellement afin de connaître leur comportement, leur temps de rétention et le spectre UV associé à chacun d'eux (données non exhaustives). L'acide aminé *D*-Iva n'a pas pu être analysé dans cette étude. Un mélange de tous les acides aminés dérivés a

ensuite été analysé pour connaître leur comportement chromatographique lors du passage des hydrolysats de séquences dérivés (Figure 3-11).

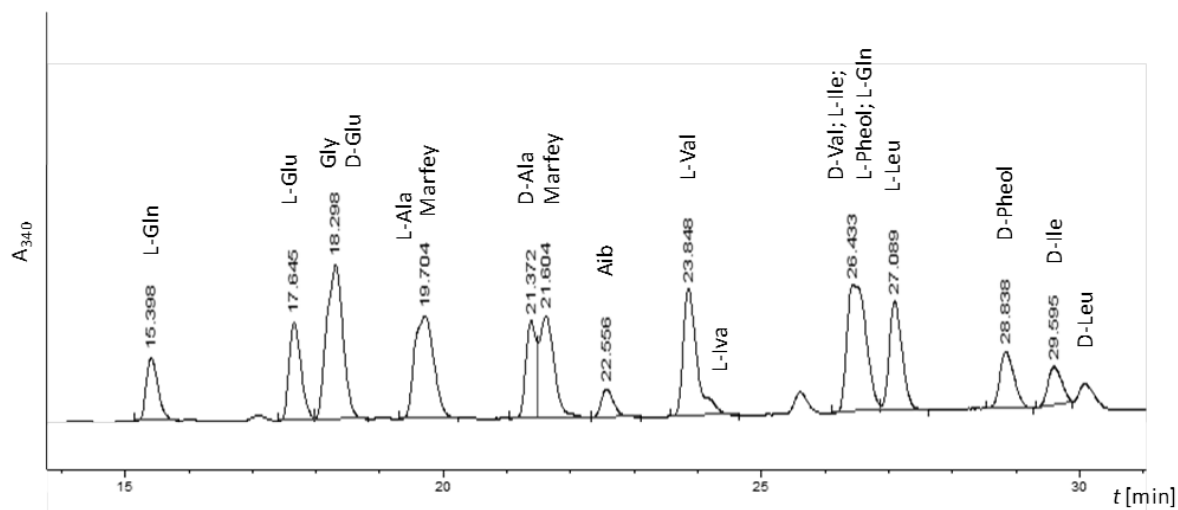


Figure 3-11 : Chromatogramme HPLC-UV (340 nm) du mélange des acides aminés standards de configuration *L* et *D* après dérivation par le réactif Marfey

Les temps de rétention des pics chromatographiques observés sur les chromatogrammes des hydrolysats de peptaïbols ont été comparés à ceux observés pour les pics chromatographiques correspondant aux standards des acides aminés. Les acides aminés ainsi que leur chiralité ont été attribués en fonction de ces observations. A titre d'exemple, les résultats obtenus pour le peptaïbol TH-15-IIb sont présentés ci-dessous (Figure 3-12).

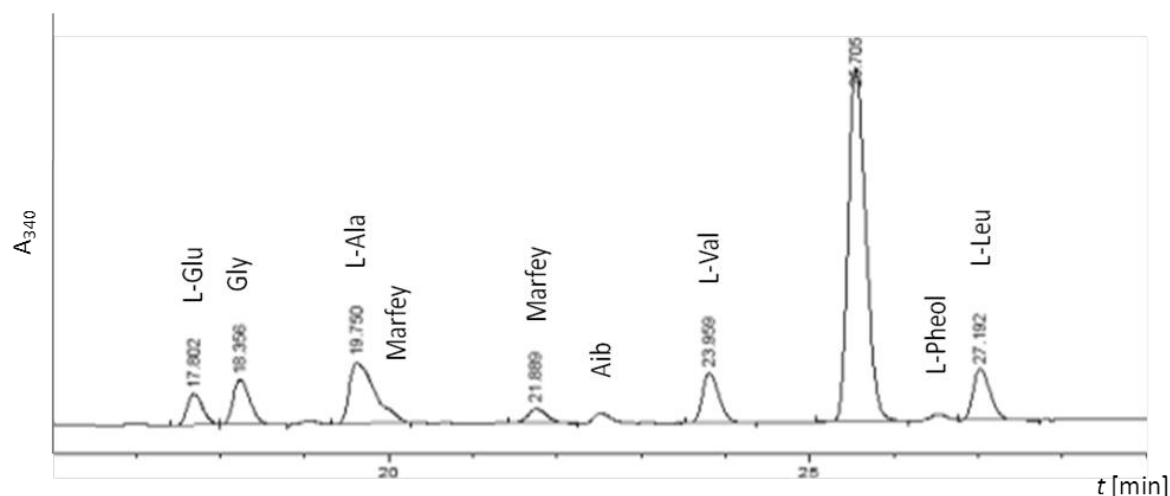


Figure 3-12 : Chromatogramme HPLC-UV (340 nm) des acides aminés du peptaïbol TH-15-IIb

Ces résultats confirment les analyses réalisées précédemment par RMN et spectrométrie de masse avec la présence des acides aminés Gly, *L*-Ala, Aib, *L*-Val, *L*-Leu, *L*-Glu et *L*-Pheol. Le *L*-Glu identifié dans l'hydrolysate provient de la *L*-Gln dont le groupement carboxamide primaire est hydrolysé en acide carboxylique lors de l'hydrolyse peptidique.

Concernant l'Iva, l'isomère *L* n'est pas observé dans l'hydrolysate. Par déduction et en adéquation avec les résultats de RMN il est donc fort probable que l'isomère *D* soit présent. Cette observation est d'ailleurs en adéquation avec les données de la littérature. En effet, les séquences peptidiques des peptaïbols sont constituées majoritairement d'acide aminés en configuration *L*, exceptée l'Iva présente en configuration *D* (Toniolo *et al.*, 1983 ; Jaworski and Brückner, 1999).

Dans les conditions de cette étude, l'isomère *L* de chaque acide aminé est élué environ 3 min avant l'isomère *D* (Figure 3-11). Par comparaison avec le comportement des autres acides aminés, le pic chromatographique attendu pour la *D*-Iva devrait donc se situer à un temps de rétention d'environ 27 min et serait donc probablement co-élué avec la *L*-Leu.

De plus, le pic chromatographique à 25,7 min qui ne correspond à aucun acide aminé de la séquence des peptaïbols ne peut être attribué à la *D*-Iva. En effet, le spectre UV correspondant

n'est pas caractéristique des acides aminés dérivés par le FDAA, comme par exemple la *L*-Val, élue à 23,95 min (Figure 3-13).

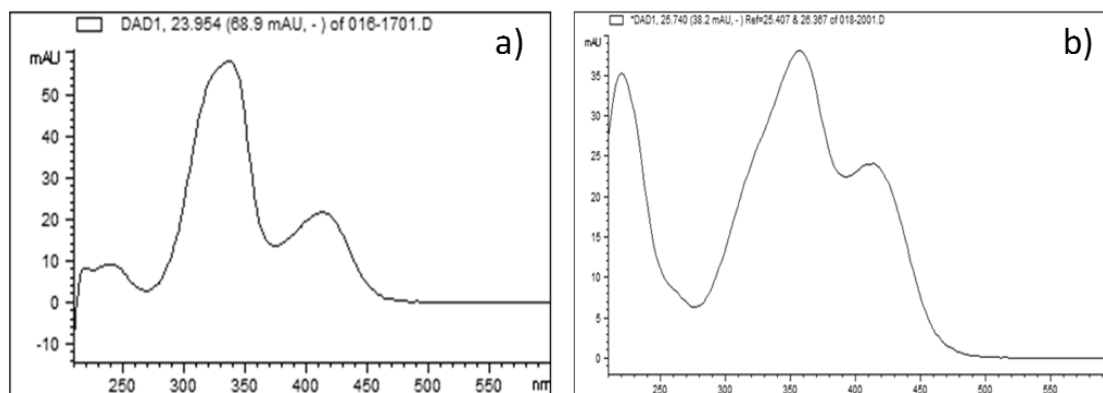
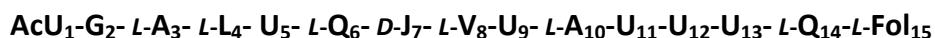


Figure 3-13 : Comparaison des spectres UV de la *L*-Val (a) et du composé élué à 25,7 min (b)

En effet, les spectres UV de tous les acides aminés dérivés par le FDAA présentent 2 bandes d'absorbances caractéristiques à 340 et 420 nm, alors que le spectre UV du pic chromatographique à 25,73 min présente 3 bandes d'absorbance à 220, 360 et 420 nm. Ce pic chromatographique peut donc être considéré comme une impureté ou un produit issu de la dérivation.

Ainsi, aux vues de ces résultats, et en complément des informations obtenues par l'analyse en RMN, il est possible de proposer pour le peptaïbol TH-15-IIb la séquence suivante :



La compilation des résultats obtenus pour l'analyse des acides aminés constitutifs des 5 peptaïbols est présentée Tableau 3-7.

Tableau 3-7 : Composition en acides aminés des peptaïbols à 15 résidus

Séquence	Acides aminés							
	G	<i>L</i> -A	U	<i>L</i> -V	<i>D</i> -J*	<i>L</i> -L	<i>L</i> -Q	<i>L</i> -Fol
TH-15-I	X	X	X	X		X	X	X
TH-15-IIa	X	X	X			X	X	X
TH-15-IIb	X	X	X	X	X	X	X	X
TH-15-IIIa	X	X	X		X	X	X	X
TH-15-IIIb	X	X	X	X	X	X	X	X

* non observée mais déduite suite aux analyses RMN

A partir de ces résultats, il est alors possible d'apporter des précisions aux séquences obtenues par fragmentation en MS (cf. Tableau 3-6, page 85).

Pour les 5 peptaïbols, seule la *L*-Leu est observée. Ainsi, aux positions 4 (et 8), les résidus Lxx peuvent être déterminés comme étant de la *L*-Leu. Pour le peptaïbol TH-15-I, le Vxx en position 8 correspond à une *L*-Val.

Quel que soit le peptaïbol analysé, la *L*-Iva n'a jamais été observée dans les hydrolysats. Ainsi, pour le peptaïbol TH-15-IIIa (et comme c'était le cas précédemment pour TH-15-IIb), on peut supposer que l'Iva₇ (déterminée par RMN) est de configuration *D*. En revanche, une incertitude subsiste pour le peptaïbol TH-15-IIIb qui présente trois Vxx aux positions 5, 7 et 8. L'analyse de l'hydrolysate montre la présence de *L*-Val qui pourrait correspondre, par analogie avec les autres séquences, au résidu 8. Par contre, il n'est pas possible à partir de ces résultats de déterminer avec certitude les deux autres Vxx (positions 4 et 7). Toutefois, par analogie avec les peptaïbols TH-15-IIb et IIIa, le Vxx₇ pourrait correspondre à la *D*-Iva. L'analyse en RMN est actuellement en cours pour ce peptaïbol et les premiers résultats obtenus en RMN 1D ¹H montrent la présence simultanée des déplacements chimiques caractéristiques des protons γ des méthyles de l'Iva et de la Val (comme c'est le cas pour le peptaïbol TH-15-IIb, cf. Figure 3-7, page 87). Ainsi, la présence dans la séquence des acides aminés *L*-Val et *D*-Iva peut être confirmée pour ce peptide sans pour autant préciser leur position. Seule l'analyse des corrélations 2D permettra de confirmer la position exacte de ces deux isomères dans la séquence.

Sur la base des informations découlant des fragmentations MS, des analyses de la composition en acides aminés et des analyses en RMN, la structure peptidique des 5 peptaïbols purifiés a pu être complétée en précisant la chiralité des acides aminés et la détermination des isomères Vxx/Lxx (Tableau 3-8).

Tableau 3-8 : Bilan des séquences peptidiques des peptaïbols TH-15-I à IIIb avec assignation des isomères

Séquence	[M+Na] ⁺ m/z	Position														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
TH-15-I	1478,8	AcU	G	L-A	L-L	U	L-Q	U	L-V	U	L-A	U	U	U	L-Q	L-Fol
TH-15-IIa	1492,8	AcU	G	L-A	L-L	U	L-Q	U	L-L	U	L-A	U	U	U	L-Q	L-Fol
TH-15-IIb	1492,8	AcU	G	L-A	L-L	U	L-Q	D-J	L-V	U	L-A	U	U	U	L-Q	L-Fol
TH-15-IIIa	1506,8	AcU	G	L-A	L-L	U	L-Q	D-J	L-L	U	L-A	U	U	U	L-Q	L-Fol
TH-15-IIIb	1506,8	AcU	G	L-A	L-L	Vx**	L-Q	D-J*	L-V*	U	L-A	U	U	U	L-Q	L-Fol

* Assignations proposées par comparaison avec les autres séquences et sur la base des données RMN 1D ¹H

** D-J ou L-V sur la base des données RMN 1D ¹H

La présence des autres peptaïbols de cette série sous forme de mélange microhétérogène après l'étape de HPLC ne nous a pas permis d'apporter des compléments d'information sur la structure des séquences obtenues par fragmentation MS (peptaïbols TH-15-IIIc à TH-15-Vb, cf. Tableau 3-6, page 86). Toutefois, sur la base des résultats obtenus pour les peptaïbols purifiés, il est probable que les Vxx présents en position 7 correspondent à la D-Iva et les Lxx en position 8 à la L-Leu. En revanche, il est plus difficile de statuer sur la nature des Vxx des positions 5 et 11.

3.4. Bilan

Ce travail a permis de décrire pour la première fois chez les *Trichoderma* sp. des peptaïbols à 15 résidus d'autant plus originaux qu'ils ne possèdent pas de proline dans leur séquence peptidique. Cette originalité pourrait ainsi traduire une voie de biosynthèse particulière.

Il est important de noter que ces peptaïbols ont également été identifiés, tous comme ceux à 11 et 14 résidus, chez une autre souche de *Trichoderma harzianum* conservée dans la mycothèque du laboratoire (MMS 675). La production de cette nouvelle série par au moins deux souches de *Trichoderma harzianum* a donc soulevé la question de l'identification de l'espèce. Sur la base du séquençage et de l'alignement des séquences ITS, ces deux souches sont considérées comme appartenant à l'espèce *harzianum*. Toutefois, les études récentes montrent que *Trichoderma harzianum* est maintenant considéré comme un complexe d'espèces très proches incluant au moins 14 espèces (Chaverri *et al.*, 2015). Leur différenciation sur la base de la comparaison des ITS n'est pas suffisante et nécessite le séquençage d'autres gènes tels que le gène codant le

facteur d'élongation de la traduction 1 (*tef1*). Un séquençage du gène *tef1* de l'ADN a donc été effectué afin de connaître avec certitude l'identification spécifique de ces deux souches. Ce travail a été effectué par l'équipe d'Irina Druzhinina de l'Université de Vienne. Les résultats obtenus après alignement des séquences ont montré d'une part que les séquences *tef1* étaient strictement identiques entre les deux souches et d'autre part que ces deux souches correspondaient finalement à une espèce nouvellement décrite par Jaklitsch et Voglmayr en 2015 sous le nom de code *Trichoderma* sp. S466 (Jaklitsch and Voglmayr, 2015). La séquence déterminée pour le gène *tef1* de la souche MMS 1255 est présentée en Annexe 2. Ainsi, il serait intéressant d'analyser les profils de production de peptaïbols chez la souche d'origine. En effet, on peut se demander si la présence des peptaïbols à 15 résidus ne pourrait pas être une caractéristique de cette espèce nouvellement décrite dans le complexe d'espèce *harzianum*.

4. Peptaïbiotiques à 17 résidus produits par des souches de *Trichoderma atroviride*

4.1. Contexte de l'étude

Trichoderma atroviride est une espèce d'où ont été identifiés diverses familles de peptaïbols à 18 (néo-atroviridines, 1730-1758 Da) (Oh *et al.*, 2005), 19 (trichorzianines, 1900-1970 Da) (El Hajji *et al.*, 1987) et 20 résidus (atroviridines, 1961-1989 Da) (Oh *et al.*, 2000), ce qui est rare chez les *Trichoderma*. En effet, généralement les espèces produisant des peptaïbols à 18 résidus ne produisent pas de 20 et inversement. D'autres peptaïbiotiques, les trichoatrokontines, consistant en des peptides à 10/11 résidus (950-1043 Da) ont également été isolés de cultures de cette espèce (Stoppacher *et al.*, 2008). C'est également une espèce commercialisée pour le contrôle biologique en agriculture par la société Agrauxine (*Esquive WP®*). Cette espèce semble donc particulièrement intéressante pour la recherche de peptaïbiotiques bioactifs. Les souches marines ont jusqu'alors été très peu étudiées. Notre mycothèque marine disposant de cinq souches, il était donc intéressant d'analyser leur profil de peptaïbols/peptaïbiotiques.

L'étude réalisée va être présentée en deux parties. Une première correspondant à un article publié dans *Chemistry and Biodiversity* (2013, 10(5), 772-786) décrit la mise en évidence,

l'isolement, le séquençage et l'étude de la cytotoxicité de plusieurs séries de peptaïbiotiques isolées de cultures de souches marines de *T. atroviride* : des peptaïbols « classiques » à 19 résidus et surtout une nouvelle série de peptaïbiotiques à 17 résidus, dont les séquences sont apparentées à celles des 19 pour les 16 premiers acides aminés mais dont il manque les 2 derniers (18 et 19) et dont le 17^{ème} est un résidu de masse 129 Da. La formule brute de ce résidu a été déterminée comme étant $C_5H_9N_2O_2$ et des hypothèses ont été formulées quant à sa formule développée mais sans conclusion absolue. La deuxième partie présentée ensuite dans ce chapitre, décrit les essais d'identification réalisés sur ce 17^{ème} résidu pour en élucider la structure.

Cette nouvelle série de peptaïbiotiques ainsi que la série des 19 résidus ont également été évalués pour leur pouvoir antifongique. Cette étude sera décrite dans le Chapitre 4 sur le contrôle biologique.

4.2. Production, purification et identification des peptaïbiotiques à 17 résidus-*Publication 1*

L'article publié dans la revue *Chemistry and Biodiversity* décrivant les résultats des travaux réalisés sur l'étude des peptaïbiotiques à 17 résidus est présent ci-dessous.

Unprecedented 17-Residue Peptaibiotics Produced by Marine-Derived *Trichoderma atroviride*

by Angélique Carroux^{a)}, Anne-Isaline Van Bohemen^{a)}, Catherine Roullier^{a)}, Thibaut Robiou du Pont^{a)}, Marieke Vansteelandt^{a)}, Arnaud Bondon^{b)}, Aurore Zalouk-Vergnoux^{a)}, Yves François Pouchus^{*a)}, and Nicolas Ruiz^{a)}

^{a)} University of Nantes, LUNAM, Faculty of Pharmacy, MMS, F-44000 Nantes
(phone : +33 2 76 64 50 75; e-mail : yves-francois.pouchus@univ-nantes.fr)

^{b)} University of Rennes I, UMR CNRS 6290, PRISM, F-35043 Rennes

In the course of investigations on marine-derived toxigenic fungi, five strains of *Trichoderma atroviride* were studied for their production of peptaibiotics. While these five strains were found to produce classical 19-residue peptaibols, three of them exhibited unusual peptidic sodium-adduct $[M + 2 Na]^{2+}$ ion peaks at m/z between 824 and 854. The sequencing of these peptides led to two series of unprecedented 17-residue peptaibiotics based on the model Ac-XXX-Ala-Ala-XXX-XXX-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Ser-Lxx-Aib-Pro-XXX-Aib-Lxx- $[C^{129}]$. The C-terminus of these new peptides was common to all of them, and its elemental formula $C_5H_9N_2O_2$ was established by HR-MS. It could correspond to the cyclized form of *N*⁶-hydroxyornithine which has already been observed at the C-terminus of various peptidic siderophores. The comparison of the sequences of 17- and 19-residue peptides showed similarities for positions 1–16. This observation seems to indicate a common biosynthesis pathway. Both new 17-residue peptaibiotics and 19-residue peptaibols exhibited weak *in vitro* cytotoxicities against KB cells.

1. Introduction. – Recurrent unexplained toxicity phenomena and shellfish mortality have led to hypothesize a fungal cause for these episodes. In this context, studies of toxigenic fungi from shellfish-farming areas have highlighted the presence of various *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, and *Trichoderma* species [1–3]. Among them, genus *Trichoderma*, due to its production of peptaibols, represents a possible cause of positivity for safety-monitoring biological tests. Indeed, these metabolites were toxic for different larval models [4][5]. Furthermore, peptaibols were able to potentiate the toxicity of some marine phycotoxins such as domoic acid [6], and they have been detected in natural samples of marine sediments and bivalves [7].

Peptaibols are linear peptides containing non-proteogenic amino acids such as α-aminoisobutyric acid (Aib), an acetylated N-terminus (Ac) and a C-terminal amino alcohol due to the reduction of the last amino acid residue [8]. If Aib is present but no C-terminal amino alcohol or the C-terminus represents another structure, the term ‘peptaibiotic’ is used. These definitions are discussed by Degenkolb *et al.* [9–11]. About 30 genera of peptaibiotic-producing fungi are known, including *Trichoderma*/*Hypocrea*.

Peptaibiotics have been studied for their potential biological activities, particularly in the context of the search for alternative sources of antibiotics [12] or as new

therapeutic agents [13]. They have been shown to exhibit a wide range of biological activities arising mainly from their membrane-modifying properties [14–17], including their antibacterial activity especially against *Gram*-positive bacteria [18–21] and dormant mycobacteria [22][23] and their antifungal activity [21], and they have been widely studied as biocontrol agents against plant fungal pathogens [24–26]. They were also reported to have antiviral activity, particularly against infection caused by the virus of tobacco mosaic [27–29], and antiparasitic activity against amoebae (*Dictyostelium* sp.) [30] and protozoa (*Plasmodium falciparum*) [31]. Peptaibols cause neuroleptic effects in mice or rats [32–35] and have cytotoxic activities against various cell lines [13][36–40]. All these activities imply that they could be involved in potential toxicity of *Trichoderma* spp. strains in the marine environment.

Few investigations of peptaibiotics produced by marine-derived *Trichoderma* have been reported so far. Published works mainly concerned the subgroups of peptaibols and aminolipopeptides [4–7][22][40–43]. In the present work, we investigated peptaibiotics of a marine-derived strain of *T. atroviride*. In this species, 18-, 19-, and 20-residue peptaibols have already been described, i.e., atroviridines (20 amino acids (AA) ; 1961–1989 Da) , neoatroviridines (18 AA ; 1730–1758 Da) [15][19][44], and trichorzianines (19 AA ; 1900–1970 Da) , respectively [45], as well as other peptaibiotics, i.e., trichoatrokontines, consisting of 10/11-residue peptides (950–1043 Da) [46]. Herein, we describe the observation and the analysis of unconventional peptaibiotic series with molecular weights between 1600 and 1660 Da in crude extracts of marine-derived *T. atroviride* strains.

2. Results. – 2.1. *Peptaibiotic Profiling in Marine-Derived Strains of Trichoderma atroviride*. Five marine-derived strains of *T. atroviride* were cultured on dextrose casein agar (DCA) medium prepared with seawater to simulate the marine environment. After extraction of the fungal biomass, crude extracts were fractionated by vacuum liquid chromatography (VLC). Peptaibiotics were principally grouped in the second fractions eluted by CH₂Cl₂/EtOH 90:10 (v/v). On fullscan spectra of these fractions obtained in ESI-MS infusion-mode, two main peptide series were visualized as singly or doubly charged ion complexes (Fig. 1, a). In zoomscan mode, the doubly charged Na-adduct ion peaks appeared at *m/z* between 824 and 854 for the first series (Fig. 1, b), and between 962 and 998 for the second one (Fig. 1, c).

The first series, due to its mass range which did not match any already described peptaibiotics, was hypothesized as a putative new group with 17 residues. The second series exhibited ion peaks of known 19-residue peptaibols. Table 1 compiles the relative zoomscan profiles for the two peptidic series in the five crude extracts. Strain MMS927 was selected to study newly observed peptides.

2.2. *Peptaibiotics Purification from Trichoderma atroviride MMS927*. *T. atroviride* MMS927 was cultured in 20 Petri dishes containing DCA medium. After extraction of the fungal biomass, the crude extract (3.09 g) was fractionated by a repetitive VLC. Fraction 2 eluted with CH₂Cl₂/EtOH 90:10 (v/v; 1.11 g) contained the two complex mixtures of peptaibiotics/peptaibols previously observed. Submitted to an open silica-gel liquid chromatography, Fr. 2 gave seven sub-fractions (2-1 to 2-7). According to MS analyses, putative 17-residue peptaibiotics were eluted in Fr. 2-4 (61.7 mg) with CH₂Cl₂/MeOH 88:12 (v/v). They were also co-eluted with the 19-residue peptaibols in Fr. 2-5

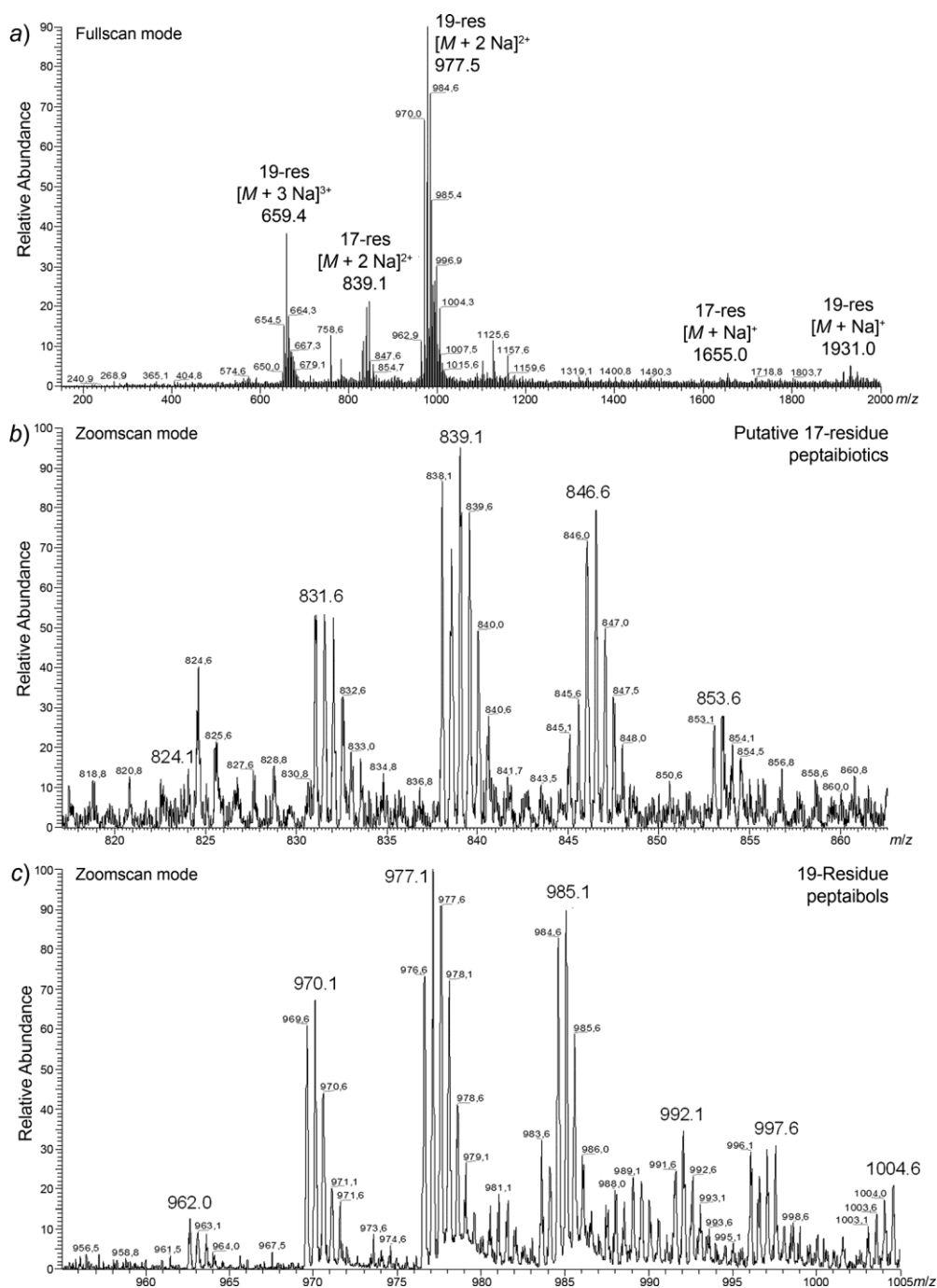


Fig. 1. MS Analysis of peptaibiotic-enriched fraction 2 of *Trichoderma atroviride* MMS927. a) ESI-MS Fullscan mass spectrum (mass range m/z 150–2000). b) ESI-MS Zoomscan mass spectrum of putative 17-residue peptaibiotics. c) ESI-MS Zoomscan mass spectrum of 19-residue peptaibols.

Table 1. MS Profiles in Zoomscan Mode of the Two Series of Observed Peptides in Marine-Derived Strains of *T. atroviride*

MS Profile	Strain	First series - putative 17-residue peptaibiotics					
$[M + 2Na]^{2+} [m/z]$		824-826	831-833	838-840	845-847	852-854	
MW [Da]		1602-1606	1616-1620	1630-1634	1644-1648	1658-1662	
Relative abundance [%]	MMS639	35	80	100	80	40	
	MMS925	0	0	0	0	0	
	MMS927	60	80	100	80	70	
	MMS1295	25	55	100	80	30	
	MMS1513	0	0	0	0	0	
MS Profile	Strain	Second series - 19-residue peptaibols					
$[M + 2Na]^{2+} [m/z]$		962-964	969-971	976-978	983-985	990-992	996-998
MW [Da]		1878-1882	1892-1896	1906-1910	1920-1924	1934-1938	1948-1952
Relative abundance [%]	MMS639	40	80	100	100	55	25
	MMS925	25	45	65	100	90	30
	MMS927	40	80	100	65	55	0
	MMS1295	15	80	100	70	35	35
	MMS1513	0	20	50	100	60	10

(130.5 mg) with $CH_2Cl_2/MeOH$ 85 : 15 (v/v). *Fr.* 2-4 and 2-5 were subjected to repetitive reversed-phase (RP) preparative HPLC. Seventeen subfractions (2-4-1 to 2-4-9 and 2-5-1 to 2-5-8, resp.) of microheterogeneous mixtures of isoforms were obtained. All the HPLC subfractions were analyzed under neutral conditions in ESI-MS infusion mode. The 17-residue peptaibiotics were collected in *Subfrs.* 2-4-1 to 2-4-3 and 2-5-1 to 2-5-3, and the 19-residue peptaibols were eluted in *Subfrs.* 2-5-3 to 2-5-8.

2.3. Sequence Analysis of the Putative 17-Residue Peptaibiotics. For each HPLC subfraction containing the putative 17-residue peptaibiotics, resolution of the microheterogeneous composition of observed ions was accomplished according to the method described in [40][41] using consecutive fragmentations in ESI-MSⁿ. As shown in *Fig. 2, a*, for *Subfr.* 2-4-1, the peptidic mixtures were revealed as singly and doubly charged sodium adducts $[M + Na]^+$ and $[M + 2Na]^{2+}$. Their sequences were obtained by identifying fragment ions of the series a_n , b_n , y_{nP} generated in positive ionization (P refers to positive-ion mode; *Fig. 2, b*) and y_{nN} generated in negative ionization (N for negative-ion mode; *Fig. 2, c*).

The assignment of the fragment ions from the specific precursor ions $[M + Na]^+$, $[M + 2Na]^{2+}$, and $[M - H]^-$ allowed the construction of a filiation graph for each microheterogeneous mixture as presented in *Fig. 3*.

The sequencing confirmed that the observed peptides were mixtures of microheterogeneous 17-residue peptaibiotics. All sequences were characterized by a constant peculiar residue in C-terminal position. The mass increment of $\Delta m/z$ 130 (*Fig. 2, b*) between $[M + Na]^+$ (m/z 1654.9) and $[b_{16} + Na - H]^+$ fragment (m/z 1524.8) corresponded to $[M_{\text{residue}} + H]$. In the same way, the $\Delta m/z$ 158 between $[M + Na]^+$ and $[a_{16} + Na - H]^+$ corresponded to $[M_{\text{residue}} + CO + H]$. This allowed us to conclude that the C-terminal residue displayed a mass of 129 Da and was then annotated $[C^{129}]$. Two 17-

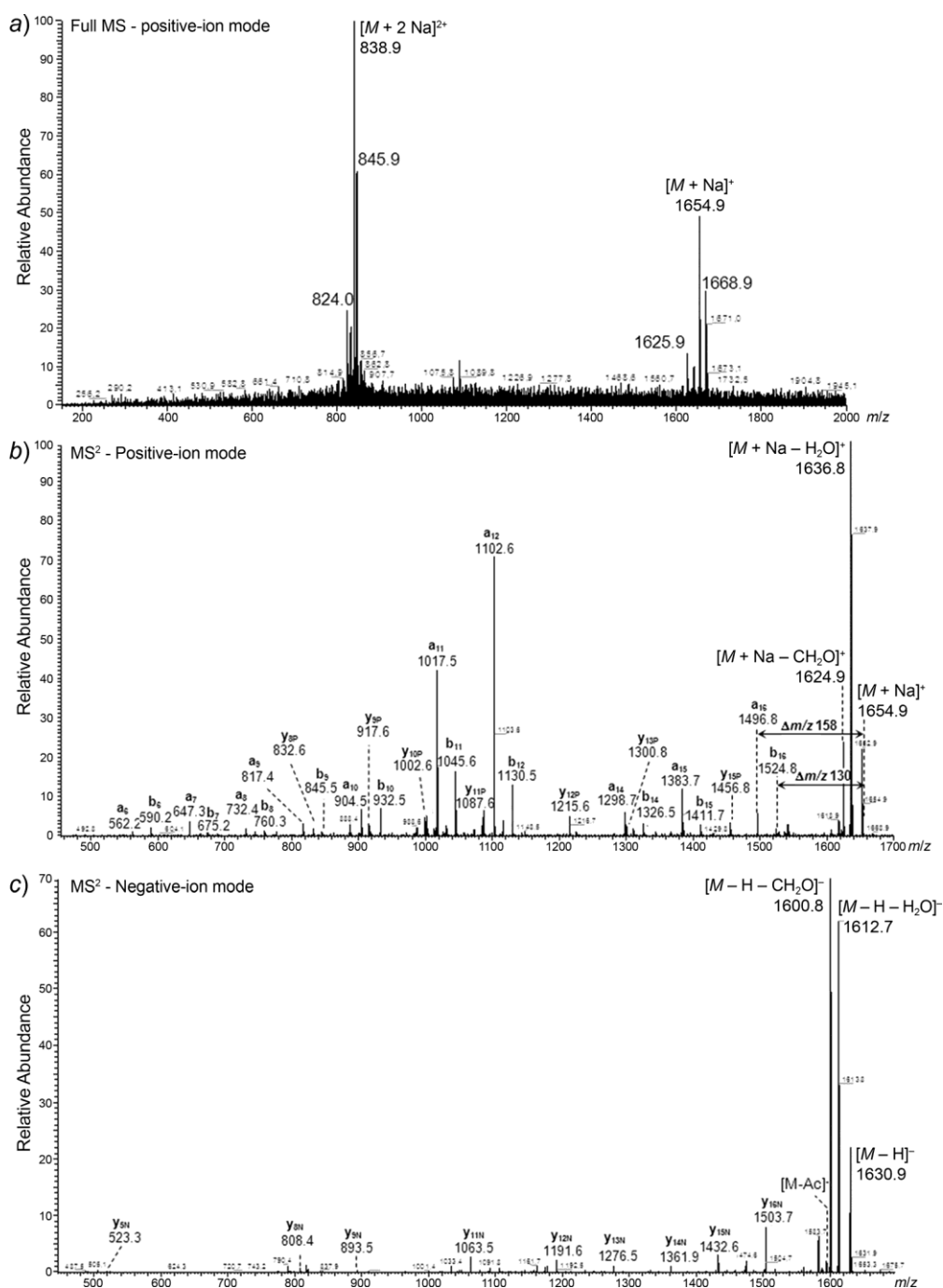


Fig. 2. Sequence determination of 17-residue peptaibiotics. a) Full MS spectrum of HPLC subfraction 2-4-1 (mass range m/z 150–2000). b) Example of a MS² fragmentation spectrum of the singly charged parent ion $[M + Na]^+$ (m/z 1654.9). c) Example of a MS² fragmentation spectrum of the deprotonated parent ion $[M - H]^-$ (m/z 1630.9)

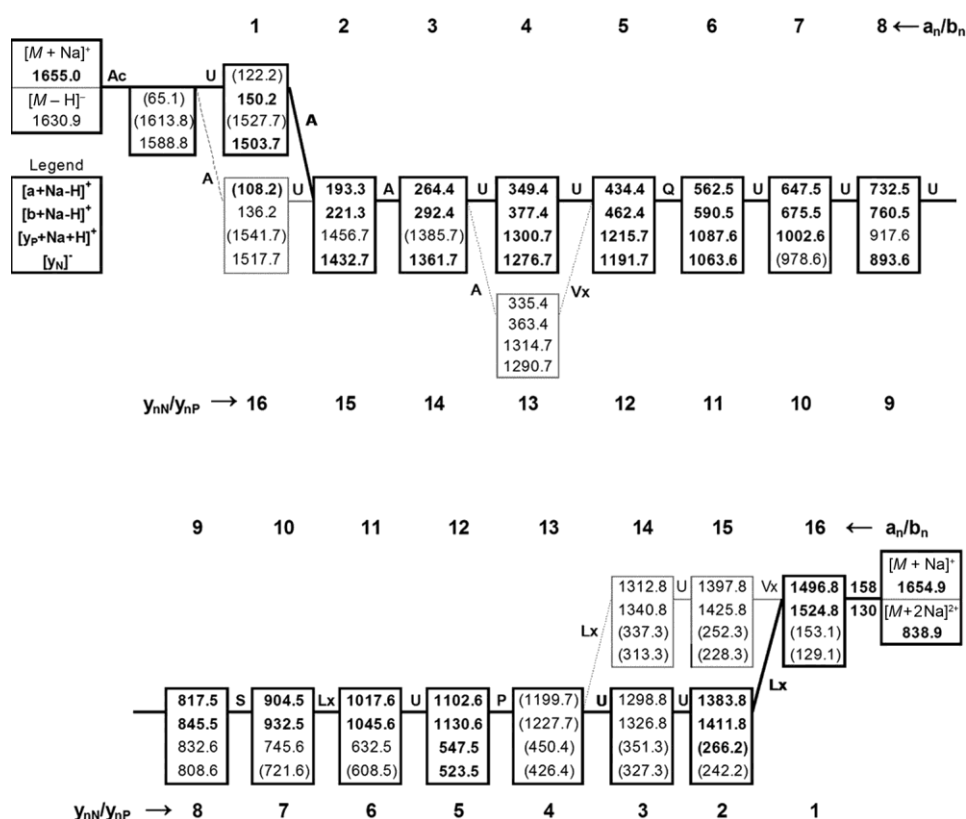


Fig. 3. Filiation graph of the fragment ions obtained by successive fragmentations in ESI-MSⁿ. Example of the mixture with parent ions $[M + Na]^+$ (m/z 1654.9), $[M + 2Na]^{2+}$ (m/z 838.9), and $[M - H]^-$ (m/z 1630.9). Major breakings are figured by bold lines and minor ones by dotted lines. Major fragment ions are indicated in bold characters, unobserved ions in brackets. Residues are given in standard single-letter codes (Ac, acetyl; U, Aib; Vx, Val/Iva; Lx, Leu/Ile).

residue peptaibiotics series were differentiated according to the residue in position 10, corresponding either to an Ala or a Ser residue (Table 2).

Sixteen Ala¹⁰ sequences, characterized by $[M + 2Na]^{2+}$ ion peaks at m/z 824, 831, 838, or 845 were identified based on the same pattern Ac-XXX-Ala-Ala-XXX-XXX-Gln-Aib-Aib-Aib-**Ala**-Lxx-Aib-Pro-XXX-Aib-Lxx-[C¹²⁹], where XXX corresponds to variable amino acids, and [C¹²⁹] is the unusual C-terminal residue. They were abbreviated as TA-17A-Ix to -IVx where TA refers to *Trichoderma atroviride*, 17 is the number of residues, and A refers to the Ala¹⁰. In the same way, 13 Ser¹⁰ sequences characterized by $[M + 2Na]^{2+}$ ion peaks at m/z 839, 846 or 853 were determined, corresponding to the general sequence pattern Ac-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-Gln-Aib-Aib-Aib-**Ser**-Lxx-Aib-Pro-XXX-Aib-XXX-[C¹²⁹] and were abbreviated as TA-17S-Ix to -IIIx.

To obtain more information about the observed [C¹²⁹] residue, Subfr. 2-4-1 was analyzed by high-resolution (HR) MS. In the positive-ion mode, the prominent singly-

Table 2. Sequences of 17-Residue Peptabiotics Observed in the Different HPLC Subfractions. Sequences are given in standard single-letter codes (Ac, acetyl; U, Aib; Vx, Val/Iva; Lx, Leu/Ile); [C¹²⁵] represents the unusual C-terminal residue.

HPLC Subfractions						[M + 2 Na] ²⁺ [m/z]	Position																	Sequence	
2-4			2-5				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	Annotation	
1	2	3	1	2	3																				
x						824	Ac	U	A	A	A	U	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Vx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17A-I a
x							Ac	U	A	A	U	A	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Vx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17A-I b
x							Ac	A	A	A	U	U	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Vx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17A-I c
x							Ac	U	A	A	U	U	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Vx	U	Vx	[C ¹²⁹]	TA-17A-I d
x							Ac	U	A	A	A	Vx	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Vx	U	Vx	[C ¹²⁹]	TA-17A-I e
						831	Ac	U	A	A	U	U	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Vx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17A-II a
x		x	x				Ac	U	A	A	A	Vx	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Vx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17A-II b
x		x	x	x			Ac	A	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Vx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17A-II c
							Ac	U	A	A	A	U	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17A-II d
							Ac	A	A	A	U	U	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17A-II e
x							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Vx	U	Vx	[C ¹²⁹]	TA-17A-II f
						838	Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Vx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17A-III a
	x	x					Ac	U	A	A	U	U	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17A-III b
x							Ac	U	A	A	A	Vx	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17A-III c
							Ac	A	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17A-III d
						845	Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17A-IV a
						839	Ac	U	A	A	U	U	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Vx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-I a
x							Ac	A	U	A	A	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Vx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-I b
							Ac	U	A	A	A	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Vx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-I c
							Ac	A	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Vx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-I d
x							Ac	U	A	A	U	U	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Vx	[C ¹²⁹]	TA-17S-I e
x							Ac	A	U	A	A	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Vx	[C ¹²⁹]	TA-17S-I f
						846	Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Vx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-II a
x		x					Ac	U	A	A	U	U	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-II b
x							Ac	U	A	A	A	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-II c
x							Ac	A	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-II d
						853	Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III a
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III b
							Ac	U	A	U	A	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III c
							Ac	A	U	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III d
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III e
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III f
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III g
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III h
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III i
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III j
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III k
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III l
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III m
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III n
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III o
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III p
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III q
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III r
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III s
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III t
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III u
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III v
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III w
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III x
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III y
							Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	[C ¹²⁹]	TA-17S-III z

charged ion peak was observed at m/z 1654.95026, corresponding to the sodium adduct ion $[M + Na]^+$ with the elemental formula $C_{75}H_{129}N_{19}O_{21}Na$ (theoretical monoisotopic mass, 1654.95076; 0.3 ppm deviation). The loss of the $[C^{129}]$ residue led to the fragment ion $[a_{16} + Na - H]^+$ peak at m/z 1496.87649 corresponding to the sequenced peptide $[AcU-A-A-U-U-Q-U-U-S-Lx-U-P-Vx-U-Lx]$ with the elemental formula $C_{69}H_{119}N_{17}O_{18}Na$ (3.3 ppm deviation). The difference, $C_6H_{10}N_2O_3$, corresponded to $[C^{129} + CO + H]$ allowing us to propose the elemental formula $C_5H_9N_2O_2$ for the $[C^{129}]$ residue. An NMR analysis of *Subfr.* 2-4-1 was performed; but the too high complexity of this mixture did not allow identification of the $[C^{129}]$ residue (data not shown).

2.4. *Sequence Analysis of the 19-Residue Peptaibols.* Observed 19-residue peptaibols eluted in HPLC *Subfrs.* 2-5-3 and 2-5-6–2-5-8 were sequenced by means of ESI-MSⁿ, applying the same methodology as for 17-residue peptides. Four sequences were determined (Table 3).

The first three sequences, abbreviated as TA-19A-I to -III, displayed $[M + 2 Na]^2+$ ion peaks at m/z 969, 976 and 983, respectively. They all belonged to the same peptide family based on the model Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-XXX-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Lxx-Aib-Pro-XXX-Aib-Lxx-Gln-Gln-Pheol (where Pheol indicates reduction of the Phe-terminal amino acid) and belonged to the Ala¹⁰-peptaibiotics family. The fourth sequence, TA-19S-Ia, displayed a $[M + 2 Na]^2+$ ion peak at m/z 984 and belonged to the Ser¹⁰ family.

2.5. *Cytotoxicity Evaluation of 17- and 19-Residue Peptides on KB Cells.* To evaluate the toxicity of the new 17-residue peptaibiotics in comparison to 19-residue peptaibols, *Fr.* 2-4 enriched in 17-residue and *Fr.* 2-5 containing both 17- and 19-residue peptides were tested for their cytotoxicities on KB cells. Both tested fractions exhibited noticeable cytotoxicities at a quite similar level. Fraction containing only the new 17-residue peptaibiotics exhibited a lower activity than the fraction containing both 17- and 19-residue peptides with IC_{50} values of $13.37 \pm 3.79 \mu g/ml$ and $6.78 \pm 0.23 \mu g/ml$, respectively.

3. Discussion. – This study highlighted an atypical peptaibiotic production of a series of 17-residue peptides with an unconventional C-terminus, rendering them an unprecedented peptaibiotics family never described so far in literature. [47] have reported, in *T. koningii* and *T. minutisporum*, the presence of metabolites corresponding to a new family of peptaibols and related peptaibiotics in ranges of molecular weights similar to those observed in the present study (between 1600 and 1700 Da), but their sequencing has not been referenced yet.

Although techniques used in this study did not achieve optimum separation of the different peptaibiotics produced, sequencing by mass spectrometry of the new family allowed partial identification of 29 sequences divided into two series. These two sets differ in the nature of the residue at position 10 which was Ala or Ser. This Ala/Ser exchange is commonly observed in peptaibols produced by various *Trichoderma* spp. For instance, this is the case for the 14-residue peptaibols of the harzianin family with an Ala/Ser at position 6 [38][48][49], or for the 18-residue peptaibols such as hypomurocins which contain an Ala/Ser at position 2 [50]. The couple Ala/Ser at position 10 has also been observed in 18- and 19-residue peptaibols, but more rarely [26][51–60]

Table 3. Sequences of 19-Residue Peptaïbiols Observed in the HPLC Subfractions 2-5-3, and 2-5-6 to 2-5-8. Fol represents the C-terminal Phenylalaninol

HPLC Subfractions 2-5				[M+2Na] ²⁺ [m/z]	Position																Sequence annotation			
3	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
	x			969	Ac	U	A	A	U	U	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Vx	U	Lx	Q	Fol	TA-19A-I a
			x	976	Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Vx	U	Lx	Q	Fol	TA-19A-II a
		x		983	Ac	U	A	A	U	Vx	Q	U	U	U	A	Lx	U	P	Lx	U	Lx	Q	Fol	TA-19A-III a
x				984	Ac	U	A	A	U	U	Q	U	U	U	S	Lx	U	P	Lx	U	Lx	Q	Fol	TA-19S-I a ^{a)}

^{a)} similar to trichorzianin TA-Vb.

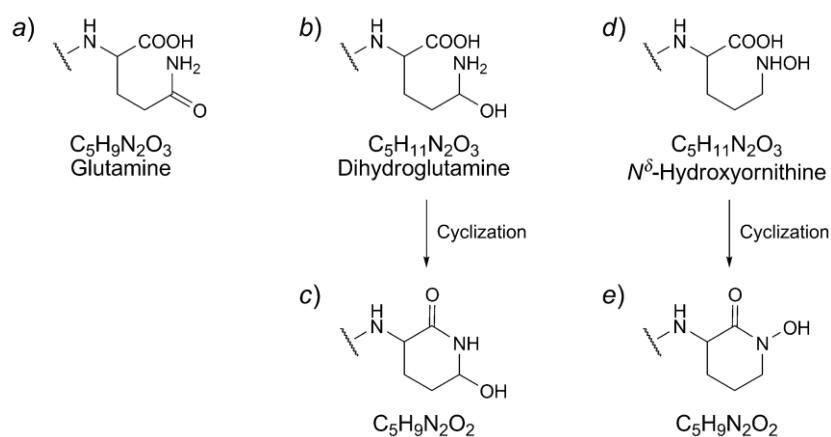
^{a)} similar to trichorzianin TA-Vb.

Observed sequences for 17- and 19-residue peptides were compared. It clearly appeared that positions 1–16 were similar. Difference occurred at position 17. For the 17-residue peptides, the sequence is stopped with the replacement of the conventionally observed glutamine (Q¹⁷) with a residue of a molecular weight of 129 Da. It could be assumed that incorporation of this atypical residue occurs as an error during the biosynthesis of 19-residue peptaibols and induces a termination of the synthesis.

Peptaibols are synthesized by specific enzymes, the non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) [26][48][61–64]. These NRPS have a modular structure where each module corresponds to a subunit responsible for self-recognition, activation, and modification of a specific AA in the peptide chain formation [65]. Each module exhibits a more or less high specificity for AA incorporation into the peptide chain, leading to the production of microheterogeneous mixtures [66]. Nevertheless, variability is reduced to a small number of peculiar AA residues. Incorporation of an abnormal residue could then terminate the process if it does not allow the peptidic chain elongation.

In the present case, the determination of the chemical nature of the atypical C-terminal residue could allow a better understanding of the reason why the biosynthesis was terminated. As selection of incorporated residues is mainly based on physico-chemical interactions between the AA and the enzyme [67], the atypical residue incorporated in position 17 must have been chemically close to glutamine (which was the expected AA). This was confirmed by HR-MS analysis which indicated that the elemental formula of the incorporated residue was C₅H₉N₂O₂, whereas the Gln residue formula is C₅H₉N₂O₃ (Scheme, a), the difference being one O-atom. However, this elemental formula does not match any residue or amino alcohol observed in peptaibols and related peptaibiotics described to date. Cyclized forms of unusual AAs such as dihydroglutamine (Scheme, c) would correspond to this formula. Nevertheless, this AA has never been observed in natural peptides. On the contrary, the cyclized form of N^δ-hydroxyornithine (Scheme, e) which also corresponds to the formula C₅H₉N₂O₂, has already been observed at the C-terminus in siderophore peptides produced by bacteria

Scheme. Structural Hypotheses of the Unusual C-Terminal [C¹²⁹] Residue



or Actinomycetes [68–73]. Furthermore, N^{δ} -hydroxyornithine has also been described as the main constituent of siderophore NRPS-peptides produced by various species of *Trichoderma*, including terrestrial strains of *T. atroviride* [74]. Only mass production of the observed peptides and their total purification will allow effective NMR analysis for the complete structural elucidation of the $[C^{129}]$ residue.

Nevertheless, a hypothesis for the biosynthesis of the observed new 17-residue peptaïbiotics can be provided: when biosynthetic enzymes are about to add the 17th residue, they might incorporate an unusual dihydro-Gln (Scheme, b) or N^{δ} -hydroxyornithine (Scheme, d) instead of the expected Gln residue. This AA would then autocyclize (as observed in previously cited peptides), leading to the loss of the free carboxylic function. The biosynthesis would then not be able to continue, and the peptide would be released from the enzyme.

The same 17-residue peptidic mixtures were observed from cultures of two other marine-derived strains of *T. atroviride*. This observation seems to indicate that this error (production of 17-residue peptaïbiotics) is reproducible and could be a chemical peculiarity of these marine-derived strains. Other non-totally elucidated peptaïbiotics have been observed by *Stoppacher et al.* (2008) [46] in a terrestrial strain of *T. atroviride*, enhancing the chemical peculiarity of this species and the interest in its peptaïbiotic production to define chemotypes.

In addition to the new 17-residue peptaïbiotics, four more conventional 19-residue peptaibols were observed. Their sequences were compared to known 19-residue peptaibols previously described in the literature. According to their characteristics, sequences TA-19A-Ia/IIa/III appeared to be similar to trichologin BIII produced by *Trichoderma strigosum* [54], only differing by the residue in position 3 (Phe is replaced by Ala) and the C-terminal amino-alcohol (Lxxol is exchanged by Pheol). TA-19S-Ia could correspond to the known trichorzianine TA-Vb firstly described from *T. harzianum* [55] and more recently observed from *T. atroviride* [45], where Lxx residues in position 11, 14, and 16 were assigned to Leu¹¹, Leu¹⁴ and Ile¹⁶, respectively.

The cytotoxicity observed for 19-residue peptaibols and new 17-residue peptaïbiotics indicates that they could both participate in the global toxicity of the producing strain. As these peptaïbiotics were observed in different marine-derived strains of *T. atroviride* isolated from shellfish and their immediate environment, the presence of this species in shellfish-farming areas could represent a potential risk for shellfish and their consumers.

The authors acknowledge the French Ministry of Higher Education and Research for granting Ph.D. students and the region Pays de la Loire for the research program *ChiMiMar*. Thanks are due to M. C. Boumard, Y. Joubert, and F. Monteau for their participation.

Experimental Part

1. *Chemicals.* CH_2Cl_2 and MeOH used for peptaibol extraction and purification were purchased from Carlo Erba and distilled prior to use; EtOH (APC 99.8%) and MeOH used for Vacuum Liquid Chromatography (VLC) and MS analyses, resp., were purchased from Baker (Deventer, Netherlands) and were of HPLC grade.

2. *Fungal Strains.* Five marine-derived strains of *Trichoderma atroviride* P.Karst. belonging to the own collection of the laboratory were used for this study. After isolation from marine samples, strains

were identified by sequencing their internal transcribed spacer (ITS) regions. Sample types, geographical origins, and Genbank accession Nos. for their ITS sequences are compiled in Table 4.

Table 4. Studied Marine-Derived *Trichoderma atroviride* Strains and Their Origins

Strain	Sample type	Geographical origin	ITS Sequence in Genbank
MMS639	Seawater	La Couplasse	JQ653056
MMS925	Sediments	Le Croisic	JQ653077
MMS927	Sediments	Le Croisic	GU947796
MMS1295	Sediments	La Couplasse	JQ653082
MMS1513	Blue mussels	Bonne Anse	JQ653085

Peptaibol Profiling by ESI-IT-MS. For peptaibol profiling, each strain of *Trichoderma atroviride* was inoculated onto a Petri dish (10-cm diameter) containing 20 ml of DCA (dextrose casein agar) medium (dextrose 40 g/l, enzymatic digest of casein 10 g/l, agar 15 g/l, Difco) using natural seawater. They were incubated for 7 d at 278. After incubation, cultures were harvested, and mycelia and conidia were scraped from the agar surface. The harvested biomass was steeped twice in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:2 then 2:1 (v/v; 30 ml each) for 30 min at r.t. The combined extracts were filtered, washed with distilled H_2O (10 ml), and evaporated to dryness to provide a crude extract. The crude extract was fractionated by vacuum liquid chromatography (VLC) on a Diol column (Chromabond (OH)₂; 10 × 50 mm, 60 Å, 45 µm, Macherey- Nagel, D-D ren) with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 98 : 2, 90 : 10, and 85 : 15 (v/v). Peptide-containing fractions eluted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 90 : 10 (v/v) were then subjected to MS analysis in infusion mode (see Fig. 1).

3. **Cultures and Fermentation of *T. atroviride* MMS927.** Strain MMS927 was inoculated onto Petri dishes (20-cm diameter) containing 125 ml of marine DCA medium. Cultures were incubated in natural light for 11 d at 278 prior to harvesting for biomass extraction, as previously mentioned.

4. **Isolation and Purification of Peptaibiotics.** After incubation, the harvested biomass was steeped twice in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:2 then 2:1 (v/v; 1200 ml each) for 2 h at r.t. The combined extracts were filtered, washed with distilled H_2O (600 ml), and evaporated to dryness to provide a crude extract. The crude extract was partitioned in aliquots of 130 mg and fractionated by repetitive VLC, as previously described. Peptide-containing fractions ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 90 : 10 (v/v)) were combined and subjected to a liquid chromatography on an open silica gel column (Chromagel; 200 × 20 mm, 60 Å, 35 – 70 µm, SDS, F-Peypin), with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95 : 5 80 : 20 (v/v). Peptaibols were eluted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 88 : 12 and 85 : 15 (v/v). The above fractions were purified by an Agilent 1050 HPLC instrument on prep. reversed phase (RP) column (Inertsil ODS-3 RP18, 10 × 250 mm, 5 µm, Interchim, F-Montluçon). Mobile phase ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 85 : 15 (v/v)) was delivered at a constant flow rate of 5 ml/min. Detection was performed at 230 nm. MeOH was of Normapur quality (SDS) and distilled prior to use. Water was purified by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). All data were acquired by HP ChemStation for LC.

5. **Mass Analyses.** Mass analyses were carried out using a LCQTM electrospray ionization ion-trap MS instrument (ESI-IT-MS; Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) in positive-ionization mode with cap. temp. of 1608, capillary voltage of 47 V, and spray voltage of 4.55 kV. Peptaibol-containing fractions were infused as MeOH solns. (0.5 µg/ml) directly into the ESI probe with a 250-ml micrometrically automated syringe (Hamilton, F-Massy) at a flow rate of 3 µl/min. All spectra were acquired and analyzed by LCQ Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific). Total current-ion mass spectra (fullscan mode) were acquired in the m/z range of 150 to 2000. Charge state and isotopic distribution were analyzed by a narrow-scan range mode (zoomscan mode).

MS Fragmentation was performed by positive and negative ionizations under the same experimental conditions described above for regular MS analysis via infusion of MeOH solns. (5 mg/ml) of microheterogeneous mixtures of peptaibols (HPLC subfractions). The sodium adduct ions $[M + \text{Na}]^+$ and $[M + 2 \text{Na}]^{2+}$ and the deprotonated ions $[M - \text{H}]^-$ were selected as precursor ions for MSⁿ. Peptaibols were sequenced using consecutive fragmentation in ESI-MSⁿ, by assignation of the diagnostic

fragment ions of the series a_n/b_n and y_{nP} produced in positive-ion mode and y_{nN} produced in negative-ion mode.

High-resolution (HR)-ESI-MS analysis was carried out with a LTQTM electrospray ionization linear ion-trap coupled with an OrbitrapTM (Thermo Fisher Scientific). Analyses were performed under neutral conditions in positive-ion mode via infusion of MeOH solns. (0.5 µg/ml) of microheterogeneous mixtures of peptaibols. HR-Mass spectra were acquired and analyzed by LCQ Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific).

6. *Cytotoxicity Assay*. KB Cells (human oral epidermoid carcinoma ATCC CCL 17, American Type Culture Collection, Rockville, MD) were cultivated in BME (Basal Medium Eagle) supplemented with 20% (v/v) fetal calf serum, 1% (v/v) glutamine 200 mM, and 1% (v/v) streptomycin/penicillin 10 mg/ml (all Biochrom KG, D-Berlin). Cells were cultivated in plastic flasks (Falcon, Becton Dickinson Labware) at 37° in a 5% CO₂-enriched atmosphere. After an incubation period of 48 h, trypsinized cells were suspended as a 200,000 cells/ml suspension, and 50 µl were put in each well of 96-well microplates (Nunc Delta Surface, Thermo Scientific Nunc). External wells were used as control : 50 ml of culture medium were added to the initial 50-ml cell suspension. Other wells received 50 ml of solvent negative control or peptaibols samples. Solvent negative control was a 10% MeOH soln. in supplemented BME (6 wells). Peptaibol samples were tested as a 5% (v/v) MeOH soln. in pure culture medium. All the *in vitro* assays were performed in triplicate. Nine peptaibols concentrations ranging from 1 to 250 µg/ml were tested. After 76 h of incubation, the cell viability was evaluated by the colorimetric MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) bioassay according to Denizot and Lang [75], and Mosman [76].

REFERENCES

- [1] A. Matallah-Boutiba, N. Ruiz, C. Sallenave-Namont, O. Grovel, J. C. Amiard, Y. F. Pouchus, Z. Boutiba, *Aquaculture* **2012**, 342–343, 75.
- [2] C. Sallenave, Y. F. Pouchus, M. Bardouil, P. Lassus, M. F. Roquebert, J. F. Verbist, *Toxicon* **1999**, 37, 77.
- [3] C. Sallenave-Namont, Y. F. Pouchus, T. Robiou du Pont, P. Lassus, J. F. Verbist, *Mycopathologia* **2000**, 149, 21.
- [4] A. Landreau, Y. F. Pouchus, C. Sallenave-Namont, J. F. Biard, M. C. Boumard, T. Robiou du Pont, F. Mondegue, C. Goulard, J. F. Verbist, *J. Microbiol. Methods* **2002**, 48, 181.
- [5] L. Poirier, F. Quiniou, N. Ruiz, M. Montagu, J. C. Amiard, Y. F. Pouchus, *Aquat. Toxicol.* **2007**, 83, 254.
- [6] N. Ruiz, K. E. Petit, M. Vansteelandt, I. Kerzaon, J. Baudet, Z. Amzil, J. F. Biard, O. Grovel, Y. F. Pouchus, *Toxicon* **2010**, 55, 805.
- [7] L. Poirier, M. Montagu, A. Landreau, M. Mohamed-Benkada, O. Grovel, C. Sallenave-Namont, J. F. Biard, C. Amiard-Triquet, J. C. Amiard, Y. F. Pouchus, *Chem. Biodiversity* **2007**, 4, 1116.
- [8] E. Benedetti, A. Bavoso, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, C. Toniolo, G. M. Bonora, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1982**, 79, 7951.
- [9] T. Degenkolb, A. Berg, W. Gams, B. Schlegel, U. Gräfe, *J. Pept. Sci.* **2003**, 9, 666.
- [10] T. Degenkolb, J. Kirschbaum, H. Brückner, *Chem. Biodiversity* **2007**, 4, 1052.
- [11] T. Degenkolb, W. Gams, H. Brückner, *Chem. Biodiversity* **2008**, 5, 693.
- [12] H. Duclouhier, *Chem. Biodiversity* **2007**, 4, 1023.
- [13] M. Shi, H. N. Wang, S. T. Xie, Y. Luo, C. Y. Sun, X. L. Chen, Y. Z. Zhang, *Mol. Cancer* **2010**, 9, 26.
- [14] L. Béven, H. Wróblewski, *Res. Microbiol.* **1997**, 148, 163.
- [15] S. U. Oh, B. S. Yun, S. J. Lee, I. D. Yoo, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 15, 384.
- [16] M. S. P. Sansom, *Q. Rev. Biophys.* **1993**, 26, 365.
- [17] M. S. P. Sansom, *Eur. Biophys. J.* **1993**, 22, 105.
- [18] C. E. Meyer, F. Reusser, *Experientia* **1967**, 23, 85.
- [19] S. U. Oh, B. S. Yun, S. J. Lee, J. H. Kim, I. D. Yoo, *J. Antibiot.* **2002**, 55, 557.

- [20] H. N. Su, Z. H. Chen, X. Y. Song, X. L. Chen, M. Shi, B. C. Zhou, X. Zhao, Y. Z. Zhang, *PLoS ONE* **2012**, 7, e45818.
- [21] M. Y. Summers, F. Kong, X. Feng, M. M. Siegel, J. E. Janso, E. I. Graziani, G. T. Carter, *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 391.
- [22] P. Pruksakorn, M. Arai, N. Kotoku, C. Vilchèze, A. D. Baughn, P. Moodley, W. R. Jacobs Jr., M. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 3658.
- [23] P. Pruksakorn, M. Arai, L. Liu, P. Moodley, W. R. Jacobs Jr., M. Kobayashi, *Biol. Pharm. Bull.* **2011**, 34, 1287.
- [24] M. Shi, L. L. Chen, X. W. Wang, T. Zhang, P. B. Zhao, X. Y. Song, C. Y. Sun, X. L. Chen, B. C. Zhou, Y. Z. Zhang, *Microbiology* **2012**, 158, 166.
- [25] A. Viterbo, A. Wiest, Y. Brotman, I. Chet, C. Kenerley, *Mol. Plant Pathol.* **2007**, 8, 737.
- [26] A. Wiest, D. Grzegorski, B. W. Xu, C. Goulard, S. Rebuffat, D. J. Ebbole, B. Bodo, C. Kenerley, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 20862.
- [27] Y. H. Kim, W. H. Yeo, Y. S. Kim, S. Y. Chae, K. S. Kim, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, 10, 522.
- [28] 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.
- [29] Y. Luo, D. D. Zhang, X. W. Dong, P. B. Zhao, L. L. Chen, X. Y. Song, X. J. Wang, X. L. Chen, M. Shi, Y. Z. Zhang, *FEMS Microbiol. Lett.* **2010**, 313, 120.
- [30] M. El Hajji, S. Rebuffat, T. Le Doan, G. Klein, M. Satre, B. Bodo, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 978, 97.
- [31] G. Nagaraj, M. V. Uma, M. S. Shivayogi, H. Balaram, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 145.
- [32] I. Berek, A. Becker, H. Schröder, A. Härtl, V. Höllt, G. Grecksch, *Behav. Brain Res.* **2009**, 203, 232.
- [33] A. Berg, P. A. Grigoriev, T. Degenkolb, T. Neuhoof, A. Härtl, B. Schlegel, U. Gräfe, *J. Pept. Sci.* **2003**, 9, 810.
- [34] T. V. Ovchinnikova, N. G. Levitskaya, O. G. Voskresenskaya, Z. A. Yakimenko, A. A. Tagaev, A. Y. Ovchinnikova, A. N. Murashev, A. A. Kamenskii, *Chem. Biodiversity* **2007**, 4, 1374.
- [35] M. Ritzau, S. Heinze, K. Dornberger, A. Berg, W. Fleck, B. Schlegel, A. Härtl, U. Gräffe, *J. Antibiot.* **1997**, 50, 722.
- [36] C. M. Boot, T. Amagata, K. Tenney, J. E. Compton, H. Pietraszkiewicz, F. A. Valeriote, P. Crews, *Tetrahedron* **2007**, 63, 9903.
- [37] C. M. Boot, K. Tenney, F. A. Valeriote, P. Crews, *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 83.
- [38] N. Hosotani, K. Kumagai, S. Honda, A. Ito, T. Shimatani, I. Saji, *J. Antibiot.* **2007**, 60, 184.
- [39] J. Peltola, A. Ritieni, R. Mikkola, P. A. Grigoriev, G. Pocsfalvi, M. A. Andersson, M. S. Salkinoja-Salonen, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 4996.
- [40] N. Ruiz, G. Wielgosz-Collin, L. Poirier, O. Grovel, K. E. Petit, M. Mohamed-Benkada, T. Robiou du Pont, J. Bissett, P. Vérité, G. Barnathan, Y. F. Pouchus, *Peptides* **2007**, 28, 1351.
- [41] M. Mohamed-Benkada, M. Montagu, J. F. Biard, F. Mondegue, P. Vérité, M. Dalgalarrodo, J. Bissett, Y. F. Pouchus, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **2006**, 20, 1176.
- [42] L. Poirier, J. C. Amiard, F. Mondegue, F. Quiniou, N. Ruiz, Y. F. Pouchus, M. Montagu, *J. Chromatogr., A* **2007**, 1160, 106.
- [43] J. Ren, C. Xue, L. Tian, M. Xu, J. Chen, Z. Deng, P. Proksch, W. Lin, *J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 1036.
- [44] S. U. Oh, S. J. Lee, J. H. Kim, I. D. Yoo, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 61.
- [45] N. Stoppacher, B. Reithner, M. Omann, S. Zeilinger, R. Krska, R. Schuhmacher, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **2007**, 21, 3963.
- [46] N. Stoppacher, S. Zeilinger, M. Omann, P. G. Lassahn, A. Roitingner, R. Krska, R. Schuhmacher, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **2008**, 22, 1889.
- [47] T. Neuhoof, R. Dieckmann, I. S. Druzhinina, C. P. Kubicek, H. von Döhren, *Microbiology* **2007**, 153, 3417.
- [48] P. K. Mukherjee, A. Wiest, N. Ruiz, A. Keightley, M. E. Moran-Diez, K. McCluskey, Y. F. Pouchus, C. M. Kenerley, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 4544.
- [49] S. Rebuffat, C. Goulard, B. Bodo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1995**, 1849.
- [50] D. Becker, M. Kiess, H. Brückner, *Liebigs Ann. Recl.* **1997**, 767.

- [51] C. Auvin-Guette, S. Rebuffat, I. Vuidepot, M. Massias, B. Bodo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1993**, 249.
- [52] H. Brückner, M. Przybylski, *J. Chromatogr. A* **1984**, 296, 263.
- [53] C. Chutrakul, M. Alcocer, K. Bailey, J. F. Peberdy, *Chem. Biodiversity* **2008**, 5, 1694.
- [54] T. Degenkolb, T. Gräfenham, A. Berg, H. I. Nirenberg, W. Gams, H. Brückner, *Chem. Biodiversity* **2006**, 3, 593.
- [55] M. El Hajji, S. Rebuffat, D. Lecommandeur, B. Bodo, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, 29, 207.
- [56] A. Iida, M. Sanekata, T. Fujita, H. Tanaka, A. Enoki, G. Fuse, M. Kanai, P. J. Rudewicz, E. Tachikawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 1070.
- [57] G. Irmscher, G. Jung, *Eur. J. Biochem.* **1977**, 80, 165.
- [58] A. Jaworski, H. Brückner, *J. Chromatogr. A* **1999**, 862, 179.
- [59] S. Rebuffat, M. El Hajji, P. Hennig, D. Davoust, B. Bodo, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, 34, 200.
- [60] S. Rebuffat, Y. Prigent, C. Auvin-Guette, B. Bodo, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 201, 661.
- [61] T. Degenkolb, R. Karimi Aghcheh, R. Dieckmann, T. Neuhoof, S. E. Baker, I. S. Druzhinina, C. P. Kubicek, H. Brückner, H. von Döhren, *Chem. Biodiversity* **2012**, 9, 499.
- [62] P. K. Mukherjee, B. A. Horwitz, C. M. Kenerley, *Microbiology* **2012**, 158, 35.
- [63] K. Reiber, T. Neuhoof, J. H. Ozegowski, H. von Döhren, T. Schwecke, *J. Pept. Sci.* **2003**, 9, 701.
- [64] X. Wei, F. Yang, D. C. Straney, *Can. J. Microbiol.* **2005**, 51, 423.
- [65] M. A. Marahiel, T. Stachelhaus, H. D. Mootz, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 2651.
- [66] S. Rebuffat, C. Goulard, S. Hlimi, B. Bodo, *J. Pept. Sci.* **2000**, 6, 519.
- [67] G. L. Challis, J. Ravel, C. A. Townsend, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 211.
- [68] K. Higashi, J. Hirose, H. Hori, T. Ishiyama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, 60, 401.
- [69] S. Kodani, F. Kobayakawa, M. Hidaki, *Nat. Prod. Res.* **2012**, doi :10.1080/14786419.2012.698412.
- [70] S. Kodani, M. Ohnishi-Kameyama, M. Yoshida, K. Ochi, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3191.
- [71] E. Mazzei, M. Iorio, S. I. Maffioli, M. Sosio, S. Donadio, *J. Antibiot.* **2012**, 65, 267.
- [72] A. Mukai, H. Komaki, M. Takagi, K. Shin-ya, *J. Antibiot.* **2009**, 62, 601.
- [73] C. Ruangviriyachai, D. U. Fernandez, M. Schaefer, H. Budzikiewicz, *Spectroscopy* **2004**, 18, 453.
- [74] S. M. Lehner, L. Atanasova, N. K. N. Neumann, R. Krska, M. Lemmens, I. S. Druzhinina, R. Schuhmacher, *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, 79, 18.
- [75] F. Denizot, R. Lang, *J. Immunol. Methods* **1986**, 89, 271.
- [76] N. T. Mosman, *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.

Received November 23, 2012

Cette étude qualitative de la production de peptaïbols par la souche de *T. atroviride* MMS 927 a permis de mettre en évidence ces nouvelles séries de peptaïbiotiques à 17 résidus avec le recensement de 29 séquences. L'hypothèse d'une voie de biosynthèse commune avec les peptaïbols à 19 résidus, faisant intervenir la même NRPS, est fortement envisagée. Ainsi, afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la biosynthèse de ces peptaïbiotiques, l'élucidation structurale de l'acide aminé C-terminal est indispensable. L'objectif suivant de ce travail a donc été de poursuivre l'étude par l'élucidation de la structure de ce résidu.

4.3. Elucidation structurale du résidu C-terminal

Les travaux précédemment réalisés ont mené à deux hypothèses de configuration structurale pour le résidu C-terminal des nouveaux peptaïbiotiques à 17 résidus. Leur analyse par spectrométrie de masse haute résolution a permis de déterminer leur formule brute, ainsi que d'en déduire la formule brute du résidu inconnu. Comme le schéma d'incorporation des résidus des peptaïbiotiques à 17 résidus semble similaire de celui des peptaïbols à 19 résidus produits par la souche MMS 927, il a été supposé que le 17^{ème} résidu de ces nouveaux peptaïbiotiques devait avoir une structure proche de la glutamine, 17^{ème} résidu retrouvé chez les peptaïbols à 19 résidus. Tel qu'il l'a été mentionné dans la publication 1, la fraction 2-4-1, correspondant à un mélange microhétérogène de peptaïbiotiques à 17-résidus (cf. Tableau 2, publication 1), a été analysée en RMN. A titre d'exemple, le spectre de RMN 1D ¹H est présenté Figure 3-14.

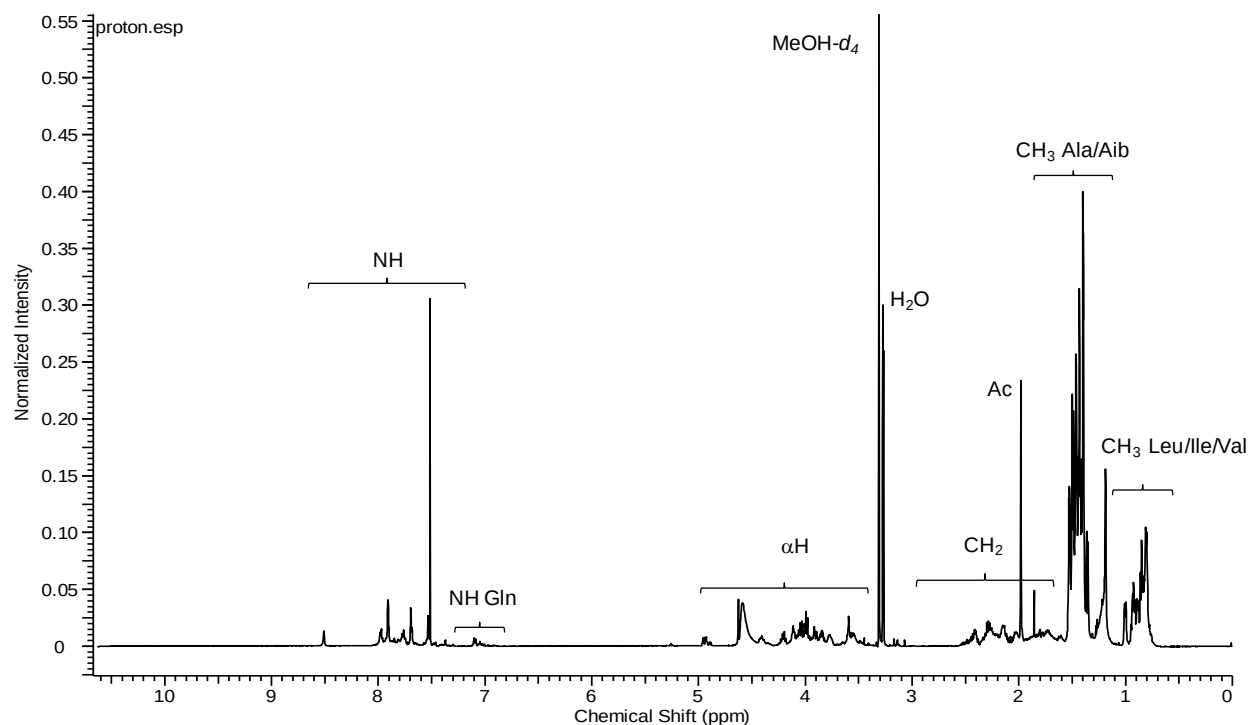


Figure 3-14 : Spectre de RMN 1D ^1H de la fraction 2-4-1 (500 MHz ; $\text{MeOH-}d_4$; 298K)

Le spectre obtenu est caractéristique des peptides avec des déplacements chimiques relatifs aux protons amides NH (6,5 à 9 ppm), aux protons α (3,3 à 4,7 ppm) et aux groupes méthylènes et méthyles (0,5 à 3,3 ppm) avec les protons β , γ et δ des chaînes latérales des différents acides aminés. Le singulet présent à 1,98 ppm caractérise l'acétyle N-terminal. L'analyse des couplages directs proton-proton et proton-carbone ont permis de confirmer la présence des acides aminés constitutifs du mélange microhétérogène et notamment la présence de Leu, Ile et Val. Toutefois, la complexité du mélange microhétérogène n'a pas permis de confirmer les hypothèses de structure du résidu C-terminal par RMN, ces analyses nécessitant des produits plus purifiés et en quantité plus importantes.

Une autre approche pour tenter d'élucider ce résidu à consister en l'analyse de la composition en acides aminés constitutifs de ces peptaïbiotiques, après hydrolyse peptidique, par HPLC-MS et GC-MS.

4.3.1. Analyse des acides aminés constitutifs

Une méthode d'analyse par HPLC-MS a tout d'abord été mise au point sur un mélange d'acides aminés standards (*L*-Leu, *L*-Ile, *DL*-Pro, Aib, *DL*-Ala, *L*-Ser, *L*-Val) constitutifs des peptaïbiotiques à 17 résidus. Plusieurs essais ont été nécessaires pour faire le choix de la colonne et l'optimisation du débit, des gradients et des solvants d'élutions. Finalement, les meilleurs résultats sont obtenus avec une colonne de phase inverse (Kromasil C₁₈, 5µm, 250 x 2 mm), une élution en gradient avec un mélange MeOH/H₂O+HCOOH 1% (5:95 → 6,4:94,6, v/v en 20 min) à un débit de 0,2 mL/min. Des pics fins sont ainsi obtenus, bien que la séparation ne soit pas optimale. En effet, les acides aminés étudiés sont trop similaires en termes de polarité. Malgré cela, il est possible grâce à la détection par spectrométrie de masse de déterminer avec certitude la présence ou non d'un acide aminé. En effet, l'ion caractéristique de la masse de l'acide aminé, ainsi que celui d'un fragment caractéristique sont repérés. Toutefois, dans ces conditions d'analyse, la sérine a une intensité 10 fois moins importante que les autres acides aminés en quantité égale. Il se pourrait que son ionisation soit moins évidente que celle des autres acides aminés (chromatogrammes non présentés).

La fraction 2-4-3 (cf. Tableau 2, publication 1), enrichie en peptaïbiotiques à 17 résidus, a été hydrolysée et analysée suivant la méthode optimisée avec les acides aminés standards. Plusieurs acides aminés sont observés et identifiés sur la base de leur temps de rétention, de leur ion moléculaire [M+H]⁺ et de leur spectre de masse caractéristique. Les temps de rétention et les chromatogrammes obtenus sont reportés ci-dessous Tableau 3-9 et Figure 3-15).

Tableau 3-9 : Temps de rétention obtenus pour les acides aminés de l'hydrolysate de la fraction 2-4-6-3 sur colonne Kromasil C₁₈

Acide aminé	<i>L</i> -Ser	<i>DL</i> -Ala	<i>DL</i> -Pro	Aib	<i>L</i> -Val	<i>L</i> -Glu	<i>L</i> -Leu	<i>L</i> -Ile
Temps de rétention (en min)	2,64	2,63	2,90	2,90	3,25 et 4,66	3,71	6,47	7,11

Les valeurs des temps de rétention obtenus pour la valine laissent penser qu'il n'y a pas que de la valine, mais peut-être un mélange de valine/isovaline. Les résultats de l'analyse en HPLC-MS sont présentés sur la Figure 3-15

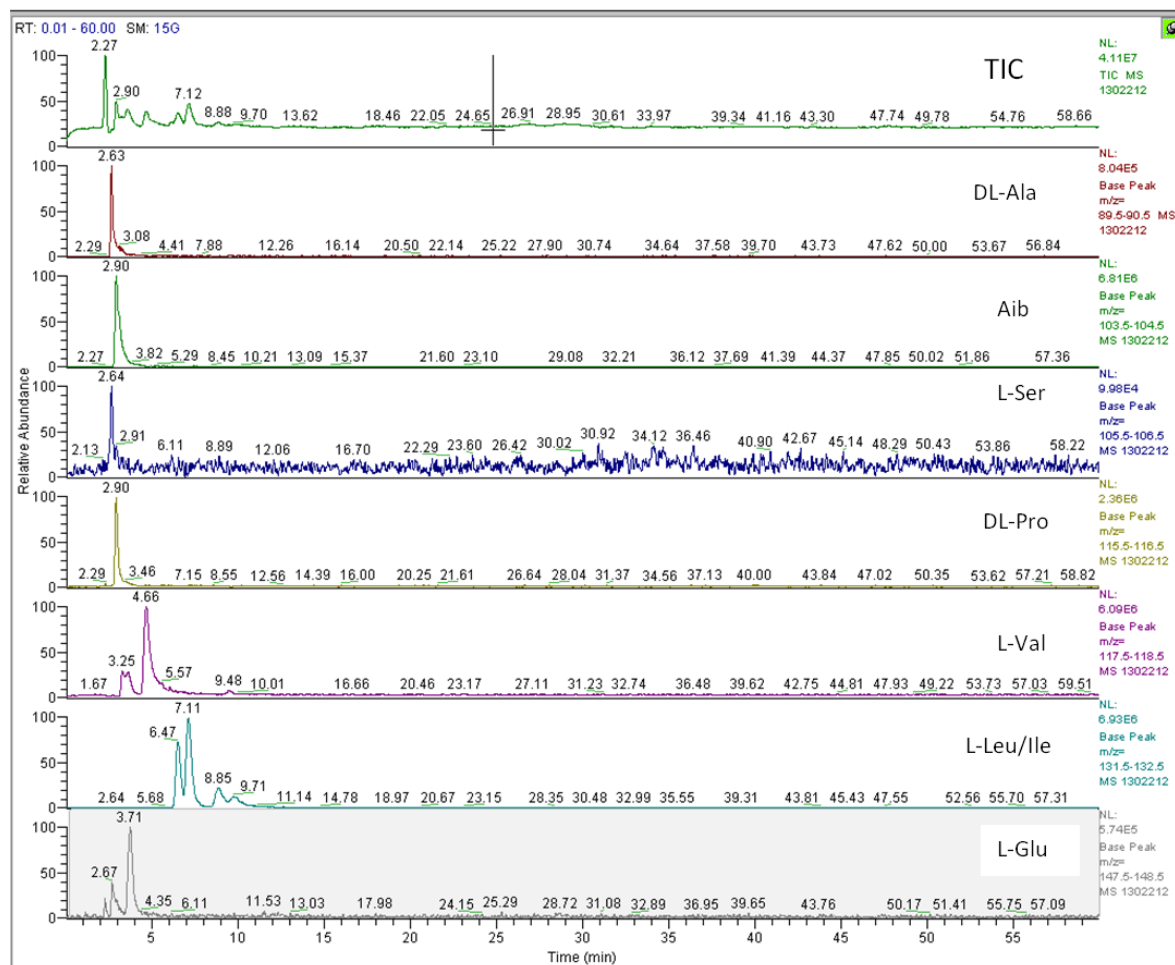


Figure 3-15 : Chromatogrammes HPLC-MS des acides aminés de l'hydrolysate de la fraction 2-4-3

En comparant les chromatogrammes obtenus pour le mélange de standards d'acides aminés et ceux obtenus pour l'hydrolysate de la fraction 2-4-3 les temps de rétention et les profils des chromatogrammes obtenus concordent, exceptée la valine qui présente 2 pics chromatographiques. Il est probable que les deux pics obtenus correspondent à la présence du couple Val/Iva à l'état naturel. Pour confirmer cette hypothèse, une analyse du standard de l'isovaline (non présent au laboratoire au moment de ces travaux) aurait été nécessaire afin de connaître son propre temps de rétention. La sérine a ici aussi une intensité moins importante que les autres acides aminés détectés. Ceci pourrait s'expliquer d'une part par son ionisation

moins effective que celle des autres acides aminés et d'autre part du fait que les séquences contenant en position 10 une sérine sont moins nombreuses que celles contenant l'alanine dans la fraction 2-4-3 (cf. Tableau 2, publication 1).

La méthode de séparation développée en HPLC-MS a été utilisée afin d'essayer d'identifier, dans l'hydrolysate, le résidu C-terminal inconnu. Les hypothèses de structures formulées, proches de la glutamine (acide aminé normalement incorporé à cette position chez les peptaïbols à 19-résidus), concernaient la dihydroglutamine et *N*-hydroxyornithine sous forme cyclisée dans le peptide. Dans les deux cas, l'hydrolyse acide devait provoquer l'ouverture du cycle (Demange *et al.*, 1990) et libérer la dihydroglutamine ou la *N*-hydroxyornithine, de masse moléculaire de 148 Da, alors détectées sous la forme d'adduit proton $[M+H]^+$ à m/z 149 (Figure 3-16).

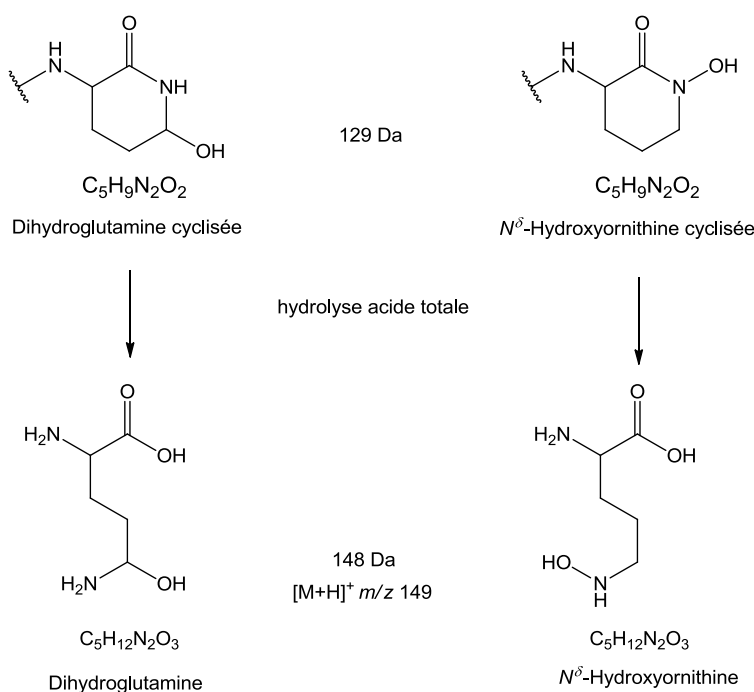


Figure 3-16 : Schéma réactionnel possibles de l'hydrolyse acide sur les résidus C-terminaux

Ces ions ont été recherchés systématiquement dans le mélange d'acides aminés de l'hydrolysate. Malheureusement les analyses n'ont pas permis de mettre en évidence leur présence. Ces premiers résultats ne permettent pas de valider les hypothèses de départ mais ne les remettent pas en cause pour autant. Il est en effet probable que la limite de détection de l'appareil soit

trop élevée pour pouvoir détecter correctement l'acide aminé correspondant au résidu C-terminal, comme c'est le cas pour la sérine. Il a donc été envisagé de procéder à une analyse des acides aminés de l'hydrolysate par GC-MS, après dérivation en esters N-trifluoroacétyl-isopropyliques, afin d'obtenir de meilleures détections des acides aminés. Le chromatogramme GC-MS obtenu pour la fraction 2-4-3 est présenté ci-dessous (Figure 3-17).

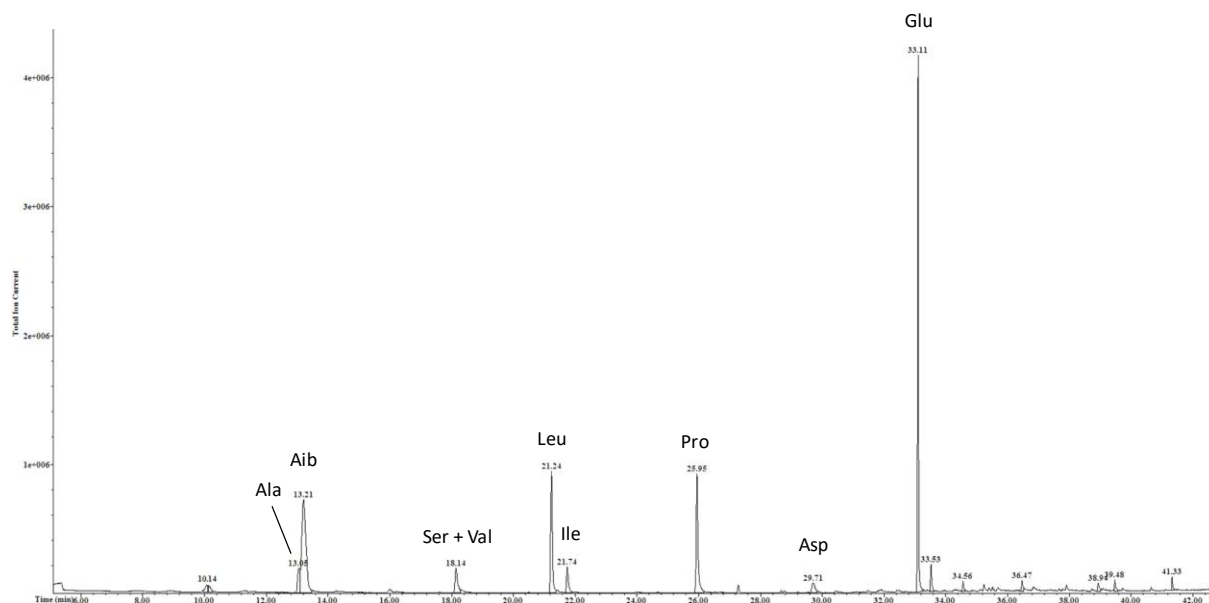


Figure 3-17 : Chromatogramme GC-MS des acides aminés dérivés de l'hydrolysate de la fraction 2-4-3

L'analyse de la composition en acides aminés de l'hydrolysate, par comparaison avec les acides aminés standards, confirme les résultats obtenus par spectrométrie de masse. Ainsi, les acides aminés Ala, Aib, Ser, Val, Leu, Ile, Pro, Glu et Ser ont été observés. Ces résultats apportent également des compléments d'information sur la nature des résidus Vxx présents dans les séquences peptidiques de la fraction 2-4-3. Les résidus Vxx peuvent être considérés comme étant de la Val, compte tenu que l'Iva n'a pas été détectée. Ces observations sont en adéquation avec les analyses RMN effectuées précédemment sur la fraction 2-4-1 qui confirmaient également la présence des acides aminés Valine, Leucine et isoleucine mais pas d'isovaline (cf. Figure 3-14, page 116).

L'observation d'un acide glutamique dans l'hydrolysate confirme la présence de la glutamine en position 6 dans ces peptides. En effet, tel que cela a déjà été mentionné précédemment lors de l'analyse des acides aminés constitutifs des peptaïbols à 15 résidus, lors de l'hydrolyse acide, la fonction amide de la chaîne latérale de la glutamine est transformée en acide carboxylique, générant un acide glutamique.

Suite à ces constatations la recherche de la présence du dérivé de l'acide aminé correspondant au résidu C-terminal inconnu a été entreprise. En reprenant les deux structures proposées, la Figure 3-18 représente les hypothèses les plus probables de modifications structurales faisant suite à l'hydrolyse acide des peptides, puis la dérivation en ester N-trifluoracétyl-isopropylique des acides aminés.

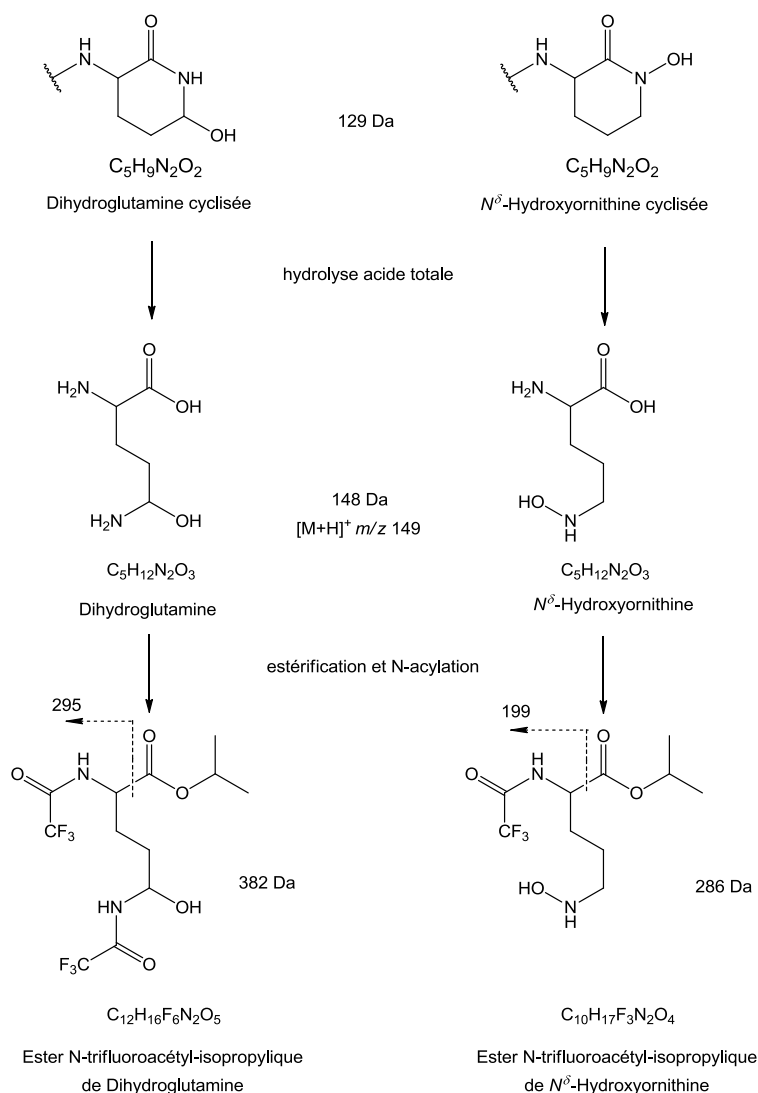


Figure 3-18 : Hypothèses de schémas réactionnels de la dérivation en esters N-trifluoroacétyl-isopropylique des acides aminés envisagés comme étant le résidu C-terminal C^[129]

Les deux acides aminés dérivés ne présenteraient pas les mêmes masses moléculaires et leurs spectres de fragmentation seraient différents, la dihydroglutamine subissant une double trifluoroacétylation contrairement à la *N*-hydroxyornithine. L'absence de telles structures dans l'hydrolysate peptidique analysé en GC-MS n'a pas permis de vérifier ces hypothèses et donc d'apporter des éléments supplémentaires pour déterminer la nature du résidu C-terminal. Toutefois, la cyclisation, au cours de la biosynthèse, d'un résidu en position 17 structuralement proche de la glutamine reste probable.

Afin de poursuivre ces investigations, nous avons alors réalisé une série de dérivations chimiques des peptides en ciblant le résidu C-terminal.

4.3.2. Dérivations chimiques des peptaïbiotiques à 17 résidus

Différentes dérivations chimiques ciblées sur le résidu C-terminal ont été réalisées afin de mettre en évidence des fonctions chimiques particulières. Ainsi, en se basant sur le postulat de départ, la présence d'une fonction carboxylique, générée après l'hydrolyse d'une structure cyclique, pourrait être estérifiée par méthanolyse ou éthanolyse acide. Cette observation a déjà été décrite dans la littérature pour les pyoverdines Pt/Pf, des sidérophores d'origine bactérienne possédant une *N*-hydroxyornithine cyclisée en position C-terminale (Demange *et al.*, 1990). Il a été montré qu'une réaction de méthanolyse chlorhydrique sur ce peptide provoquait l'ouverture du cycle en formant l'acide carboxylique C-terminal (+18) puis son estérification par le méthanol (+14) entraînant un gain de masse de 32 par rapport au peptide initial.

Dans notre cas et par analogie avec l'étude de Demange, la méthanolyse chlorhydrique, effectuée dans des conditions moins agressives que l'hydrolyse acide réalisée pour l'analyse des acides aminés constitutifs, permettrait une action ciblée sur le résidu inconnu. En effet, si le résidu C-terminal est présent dans le peptide sous forme cyclisée, l'ouverture du cycle et l'estérification du résidu C-terminal pourraient être attendues. La Figure 3-19 présente les modifications de structure supposées pour les deux résidus suite à une méthanolyse chlorhydrique, entraînant une augmentation de masse de 32.

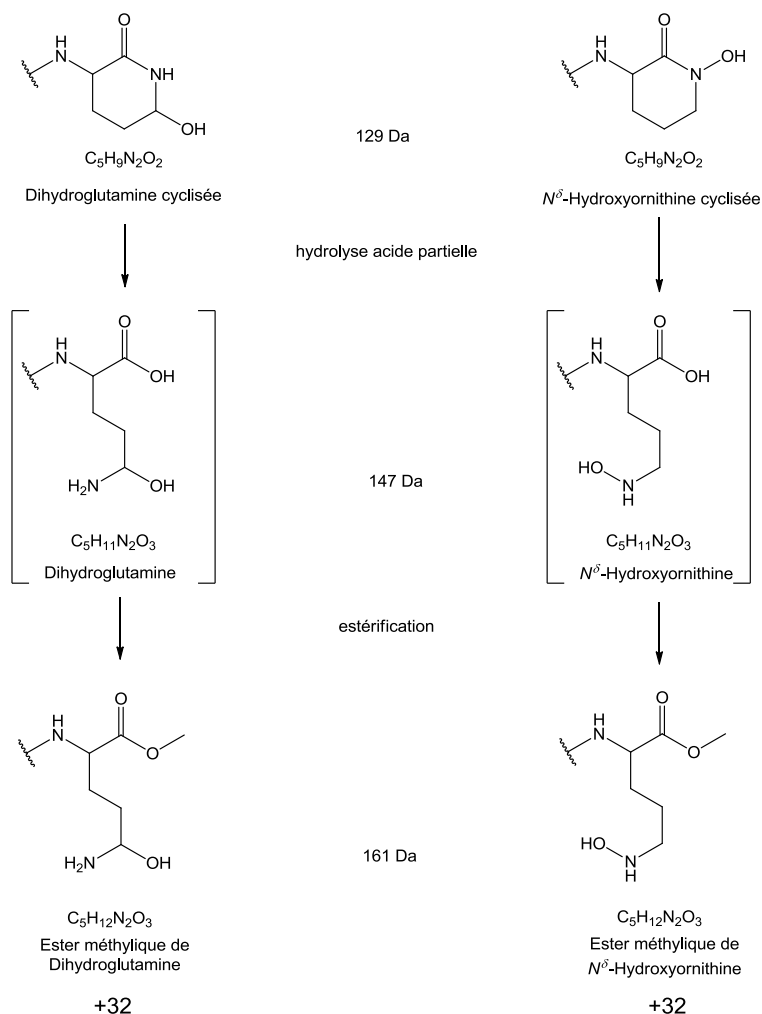


Figure 3-19 : Schéma réactionnel de l'estérification des acides aminés envisagés comme étant le résidu C-terminal C^[129]

Afin de vérifier cette hypothèse, une méthanolyse chlorhydrique a été effectuée sur la fraction 2-4-3. Les peptides transformés ont été analysés par spectrométrie de masse et comparés aux peptides d'origine. Les spectres de masse observés en mode zoomscan avant et après réaction sont présentés Figure 3-20.

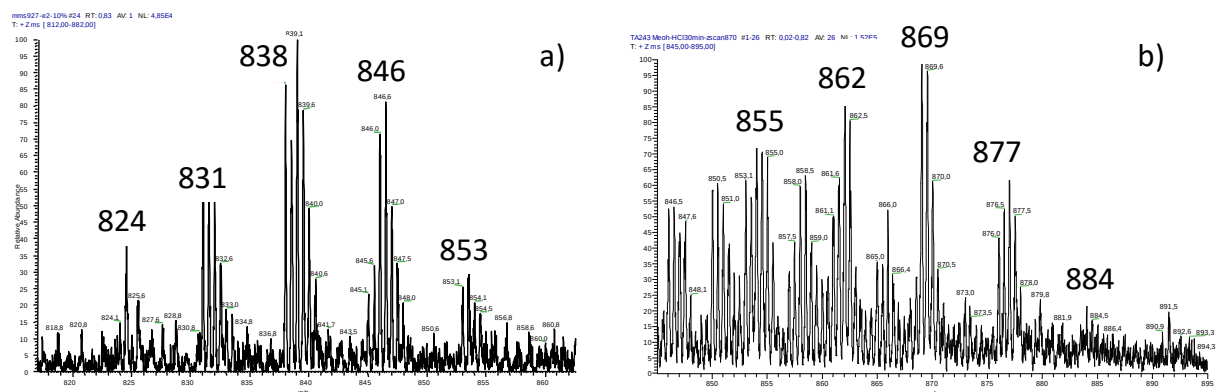


Figure 3-20 : Spectres de masse de la fraction 2-4-3 a) avant et b) après méthanolyse chlorhydrique

Les ions observés avant et après méthanolyse chlorhydrique concernent les adduits $[M+2Na]^{2+}$ dans une fenêtre m/z de 800 à 900. La comparaison des profils permet de mettre en évidence une augmentation de 31 des ions bichargés après réaction. Ainsi, l'ion $[M+2Na]^{2+}$ m/z 838 est transformé en l'ion m/z 869 après réaction. Cette différence représente donc un gain de masse de 62 entre les peptides d'origine et ceux transformés après méthanolyse chlorhydrique (Tableau 3-10).

Tableau 3-10 : Transformation des peptaïbiotiques à 17 résidus de la fraction 2-4-3 après méthanolyse chlorhydrique

Adduits $[M+2Na]^{2+}$		Adduits $[M+Na]^+$		Différence de masse
Avant	Après méthanolyse	Avant	Après méthanolyse	
824	855	1625	1687	62
831	862	1639	1701	62
838	869	1653	1715	62
846	877	1667	1729	62
853	884	1681	1743	62

Ces différences ont été confirmées après séquençage des peptides transformés et notamment en comparant les graphes de filiation obtenus après méthanolyse avec ceux des peptides d'origine. Cette transformation se traduit à deux positions dans les séquences peptidiques au niveau de la glutamine en position 6 (+15) et du résidu C-terminal (+47) comme c'est le cas pour le peptide présentant les adduits bi et monochargés à m/z 869 et 1715 (Figure 3-20).

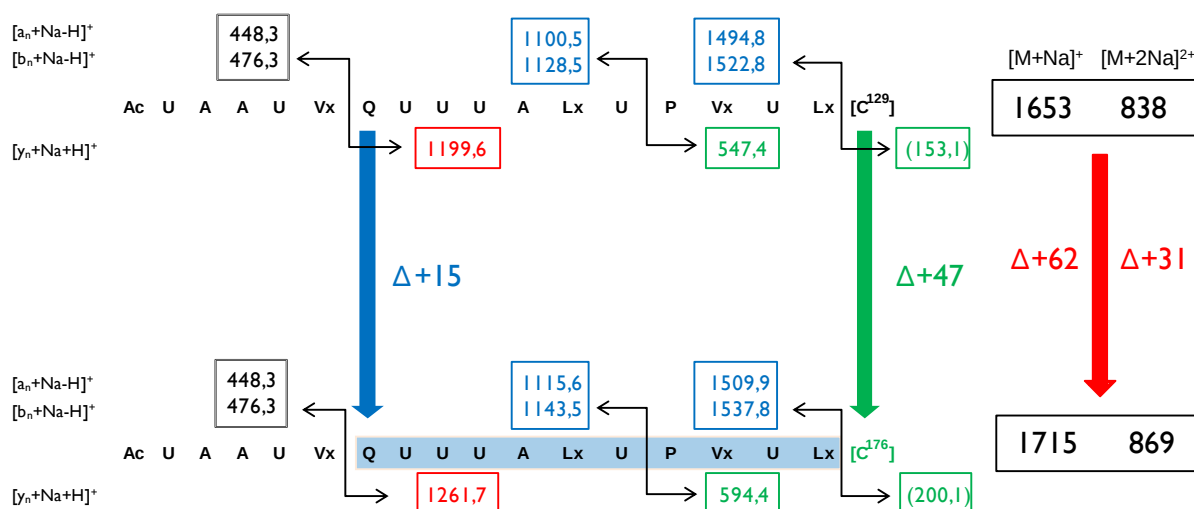


Figure 3-21 : Modifications de séquence, après méthanolyse chlorhydrique, déterminées pour l'ion $[M+2Na]^{2+}$ m/z 838

Le gain de masse de 15 au niveau de la Gln₆ peut s'expliquer pendant la méthanolyse chlorhydrique par l'hydrolyse acide de la fonction amide de la chaîne latérale générant l'acide carboxylique puis l'ester méthylique en présence de méthanol (de la même façon que lors de la dérivation en ester trifluoroacétyl-isopropylique lors de l'analyse en GC-MS). La Gln en position 6 est alors transformée en ester méthylique de l'acide glutamique (Glu-OMe). Cette transformation sélective a déjà été décrite pour une 3-hydroxyglutamine présente dans un lipopeptide cyclique fongique fongicide, la pneumocandine B₀ (Zambias et al., 1995). En effet, suite à une méthanolyse acide réalisée en présence d'acide paratoluène sulfonique (APTS), la 3-hydroxyglutamine était transformée en son dérivé d'ester méthylique.

En ce qui concerne la modification du résidu C-terminal, le gain de masse de 47 au lieu de 32 n'est pas en concordance avec les deux structures proposées. Pourtant, lors de la fragmentation de l'ion $[M+Na]^+$ m/z 1715, l'ion fils majoritairement généré est observé à m/z 1683 $[M+Na-32]^+$. La différence de 32 pourrait traduire la perte du groupement $-OCH_3$ de la glutamine transformée et/ou du résidu C-terminal transformé, libérant une molécule de méthanol. Dans ce deuxième cas, l'ion fragment $[M+Na-32]^+$ pourrait donc être en adéquation avec la présence d'une structure cyclisée qui s'ouvrirait pendant la méthanolyse chlorhydrique. Par contre, un écart de masse de 15 (47-32) subsiste et pourrait s'interpréter comme la transformation d'une fonction amide en ester méthylique, comme c'est le cas pour la fonction amide de la chaîne

latérale de la Gln₆, transformée en ester méthylique. Si cette hypothèse se vérifiait, elle irait à l'encontre de la présence d'une structure cyclisée telle que celles proposées précédemment.

La méthanolyse acide de la fraction 2-4-3 a également été réalisée en remplaçant l'acide chlorhydrique par l'APTS afin de se rapprocher des conditions utilisées dans l'étude précédemment citée de *Zambias et al.* (1995). Les résultats obtenus, similaires à ceux obtenus lors de la méthanolyse chlorhydrique, avec un gain de masse de 62 permettent de confirmer la réactivité de la Gln₆.

Les réactions de méthanolyse acide, qu'elles soient catalysées par l'HCl ou l'APTS, vont dans le même sens et apportent des informations structurales contradictoires sur le résidu C-terminal (Figure 3-22). En effet, elles suggèrent la présence à la fois d'une structure cyclisée qui s'ouvrirait et permettrait la formation d'un ester méthylique (+32, Figure 3-22, a) et d'une fonction amide (probablement sur une chaîne latérale), qui serait remplacée par un ester méthylique comme c'est le cas pour la glutamine (+15, Figure 3-22, b).

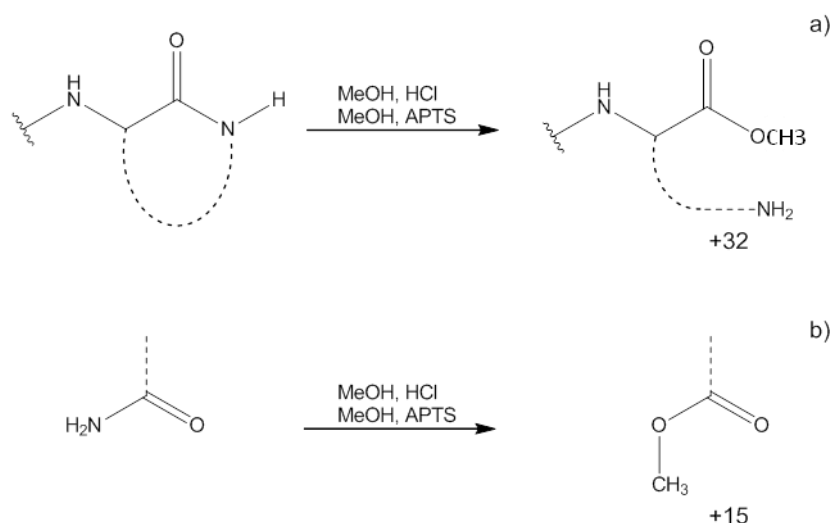


Figure 3-22 : Informations structurales découlant des réactions de méthanolyse acide

Une éthanolyse chlorhydrique a été effectuée sur la fraction 2-4-3 dans les mêmes conditions que la méthanolyse chlorhydrique afin de comparer les peptides transformés. Les spectres de masse en mode zoomscan avant et après réaction sont présentés ci-dessous (Figure 3-23).

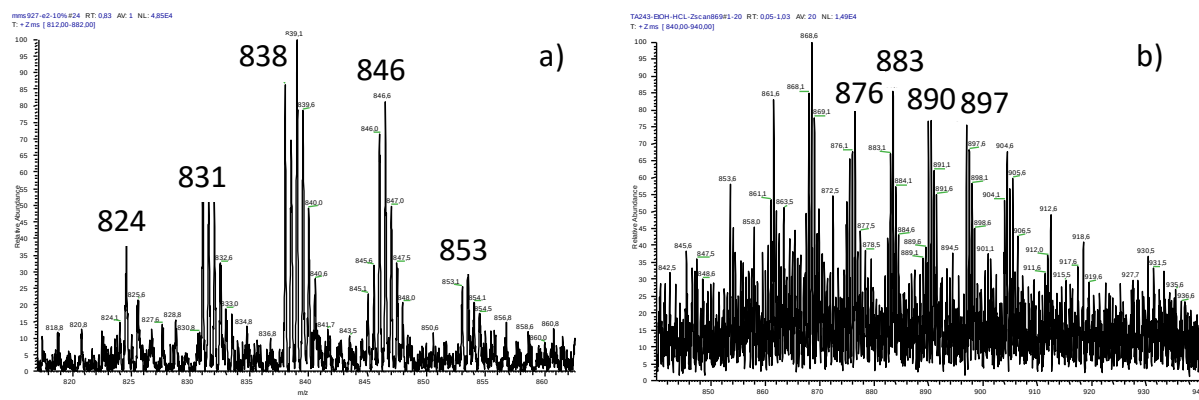


Figure 3-23 : Spectres de masse de la fraction 2-4-3 a) avant et b) après éthanolyse chlorhydrique

La comparaison des profils permet de mettre en évidence un gain de masse, après réaction, de 62 des m/z des ions bichargés (ion m/z 838 transformé en 890 par exemple). Cette différence représente donc un gain de masse de 104 entre les peptides d'origine et ceux transformés après éthanolyse chlorhydrique. Comme c'était le cas précédemment, cette transformation se traduit aux mêmes positions de la séquence peptidique, au niveau de la Gln₆ (+29) et du résidu C-terminal (+75) (

Figure 3-24).

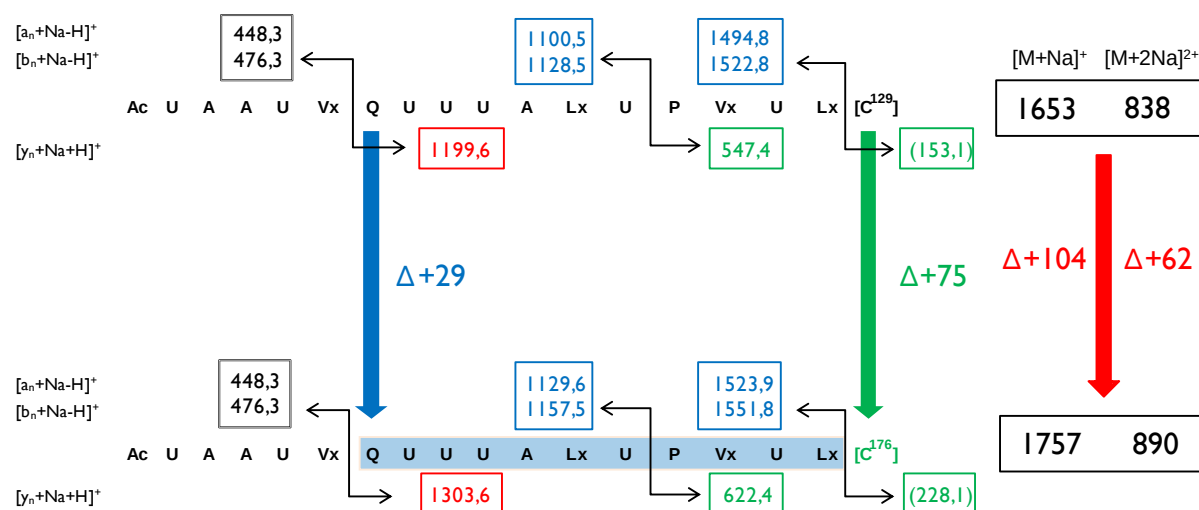


Figure 3-24 : Modification de séquence, après éthanolyse chlorhydrique, déterminées pour l'ion $[M+2Na]^{2+} m/z$ 838

L'augmentation de masse de 29 sur la Gln₆ suggère la transformation de la fonction amide en ester éthylique, de la même manière que lors de la méthanolyse chlorhydrique. Lors de la

fragmentation de l'ion $[M+Na]^+$ m/z 1757, l'ion fils majoritairement généré est observé à m/z 1725, ce qui correspond à une perte de masse de 32. La présence de cet ion reste inexplicée. En revanche, un deuxième ion de fragmentation, moins intense, apparaît à m/z 1711 et pourrait correspondre au clivage d'un groupement $-OCH_2CH_3$ et à la libération d'une molécule d'éthanol (perte de 46). Dans ce cas, et comme précédemment, un écart de masse de 29 (75-46) subsisterait sur le résidu C-terminal transformé et pourrait être interprété comme la greffe d'un groupement $-OCH_2CH_3$ à la place d'un groupement NH_2 sur le résidu C-terminal, de manière analogue à la transformation de la Gln₆.

Les résultats apportés par cette étude concordent avec ceux obtenus par méthanolyse acide, sans pour autant permettre d'apporter des informations supplémentaires sur la nature et la structure du résidu C-terminal. Toutefois, les analogies entre ces différentes réactions suggèrent la présence d'une fonction amide qui présenterait la même réactivité que celle de la Gln₆ (cf. Figure 3-22, page 127).

Si l'on part de l'hypothèse d'une structure non cyclisée proche de la glutamine, le résidu C-terminal pourrait correspondre à une glutamine dont l'acide carboxylique aurait été réduit en aldéhyde pour former un « glutaminal ». Une protection par l'éthylène glycol en milieu acide pourrait confirmer cette hypothèse. En effet, l'éthylène glycol réagit préférentiellement sur les fonctions cétones ne présentant pas de gêne stérique pour former un acétal cyclique. La fonction aldéhyde C-terminale devrait alors être protégée et l'augmentation de la masse des peptides transformés (+44) facilement détectable en spectrométrie de masse (Figure 3-25).

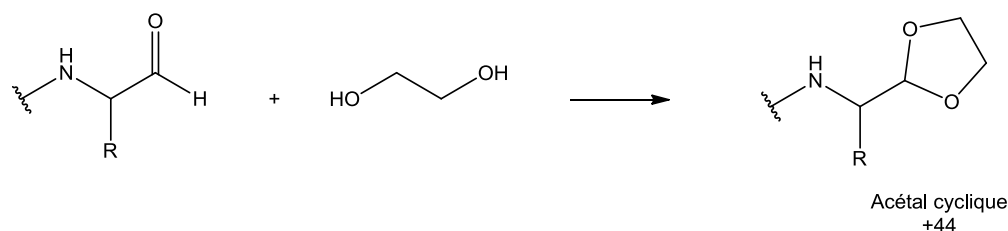


Figure 3-25 : Hypothèse de protection de la fonction aldéhyde C-terminale par l'éthylène glycol

Cette hypothèse a été vérifiée sur la fraction 2-4-3. Les spectres de masse en mode « zoom scan » avant et après réaction sont présentés ci-dessous (Figure 3-26)

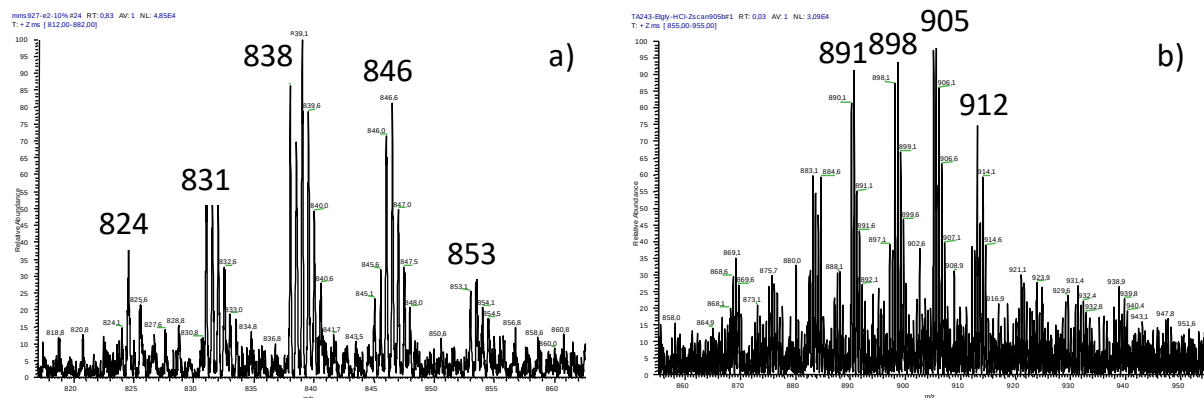


Figure 3-26 : Spectres de masse de la fraction 2-4-3 a) avant et b) après réaction avec l'éthylène glycol

Les ions observés après réaction avec l'éthylène glycol diffèrent de ceux de la fraction initiale avec une différence de 67 entre les ions bichargés (m/z 838 transformé en 905, par exemple). Cette différence représente ainsi un gain de masse de 134 entre les peptides d'origine et ceux transformés. Le séquençage des peptides transformés permet de localiser ces augmentations de masse au niveau de la Gln_6 (+45) et du résidu C-terminal (+89) (Figure 3-27).

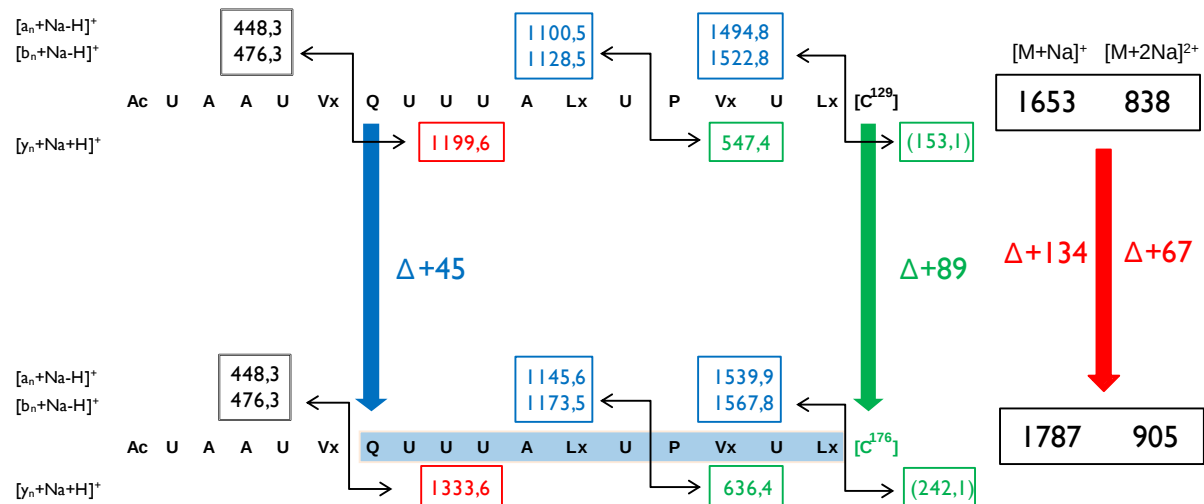


Figure 3-27 : Modifications de séquence, après réaction avec l'éthylène glycol, déterminées pour l'ion $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ m/z 838

Par analogie avec les résultats obtenus précédemment, l'augmentation de masse de 45 sur la Gln₆ pourrait s'expliquer par la réaction de l'éthylène glycol avec l'amide générant ainsi un ester d'éthylène glycol, bien que ce type de réaction ne soit pas couramment observé.

Toujours par analogie avec les résultats précédents, l'augmentation de masse de 89 au niveau du résidu C-terminal pourrait correspondre d'une part, à l'estérification d'une fonction amide (+45) de même nature que celle observée sur le résidu Gln₆ et d'autre part, à la réaction de protection de la fonction aldéhyde attendue dans le cas d'un « glutaminal » (+44) (Figure 3-28). Le fait que ce groupement soit très stable expliquerait l'absence d'ion fragment caractéristique [M+Na-44].

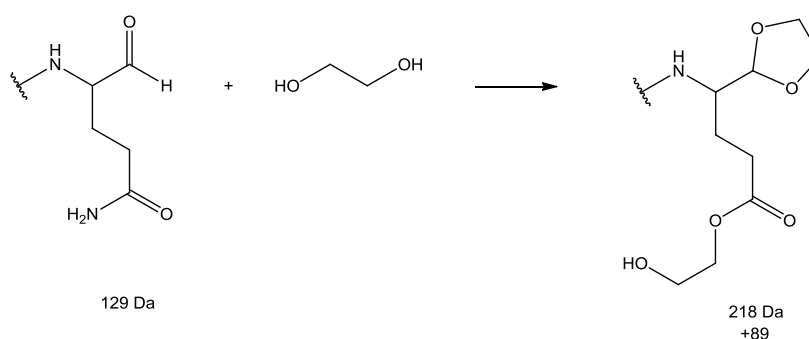


Figure 3-28 : Hypothèse de réaction de l'éthylène glycol sur le glutaminal (+89 u)

Cette hypothèse de structure pourrait également expliquer les gains de masse observés (+46/+74) lors des dérivations précédentes. En effet, la présence d'alcool (MeOH/EtOH) en condition acide pourrait permettre d'une part l'estérification de la fonction amide de la chaîne latérale (+15/+29) et d'autre part l'acétalisation de la fonction aldéhyde en fonction hémiacétalique (+32/+46). La Figure 3-29 résume les hypothèses de modifications structurales d'un résidu glutaminal C-terminal découlant des trois dérivations effectuées.

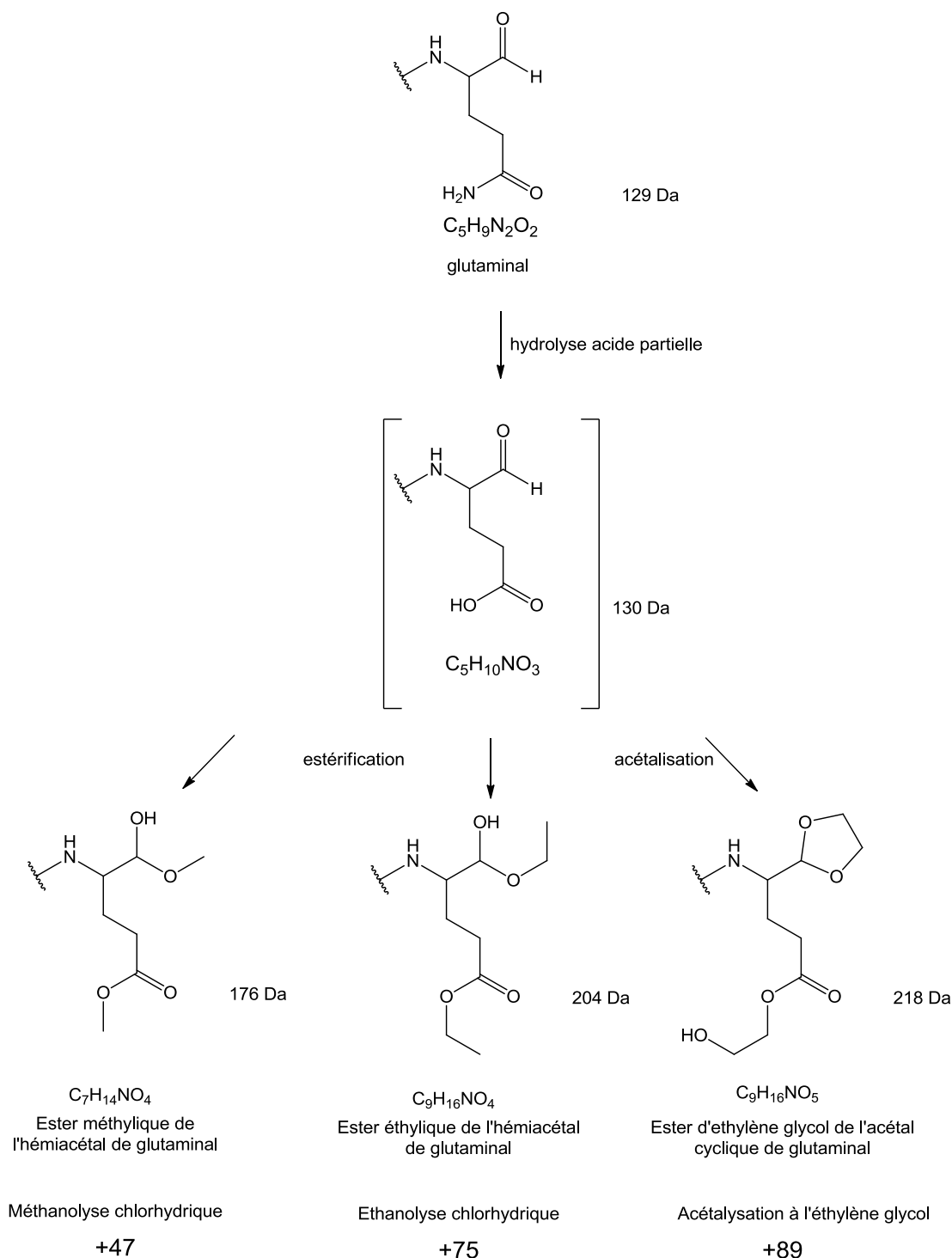


Figure 3-29 : Bilan des modifications structurales proposées pour un glutaminal C-terminal

Toutefois, bien que la présence d'un glutaminal C-terminal semble probable sur la base de ces résultats, cette hypothèse est infirmée si l'on considère les analyses réalisées par RMN. En effet, sur les spectres 1D 1H , comme c'est le cas pour la fraction 2-4-1 (cf. Figure 3-14, page 116),

aucun signal très déblindé n'est observé dans la plage des déplacements chimiques 9,5-10,5 ppm caractéristique du proton aldéhydique.

Afin de faire un bilan sur les dérivations effectuées, les modifications de séquences observées en position 6 (Gln) et 17 (C^[129]) ont été compilées Tableau 3-11.

Tableau 3-11 : Bilan des dérivations chimiques effectuées sur les peptaïbiotiques à 17 résidus de la fraction 2-4-3

Gains de masse – fonctions chimiques modifiées			
	Peptide	Résidu Gln ₆	Résidu C-terminal C ^[129]
Méthanolyse acide	+62	+15 CONH ₂ → COOCH ₃	+47 +32 ? + OCH ₃ ? +15 ? CONH ₂ → COOCH ₃ ? M-32 → perte MeOH
Ethanololyse acide	+104	+29 CONH ₂ → COO CH ₂ CH ₃	+75 +46 ? + OCH ₂ CH ₃ ? +29 ? CONH ₂ → COOCH ₂ CH ₃ ? M-46 → perte EtOH M-32 → ?
Réaction à l'éthylène-glycol	+134	+45 CONH ₂ → COO (CH ₂) ₂ OH	+89 +44 ? Cyclisation OCH ₂ CH ₂ O ? +45 ? CONH ₂ → COO(CH ₂) ₂ OH ?

Les gains de masse observés lors des méthanolyse et éthanolyse acides, avec l'observation de la perte de molécules de méthanol ou d'éthanol par fragmentation des peptides transformés, laissent suggérer l'ouverture d'un cycle par hydrolyse et l'estérification de la fonction carboxylique, ce qui serait en adéquation avec les hypothèses de départ. Toutefois, les structures cyclisées ne permettent pas d'expliquer la totalité des gains de masse obtenus et des interrogations subsistent quant à la structure de ce résidu.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, il apparaît clairement une analogie entre la réactivité de la fonction amide de la chaîne latérale de la Gln₆ (l'Annexe 3 reprend toutes les modifications structurales observées ou déduites pour ce résidu) et la réactivité du résidu C-terminal. Cette observation confirme d'une part, que le résidu C-terminal des peptaïbiotiques à

17 résidus doit être structuralement proche de la glutamine, acide aminé normalement incorporé en position 17 pour les peptaïbols à 19 résidus et conforte d'autre part l'idée d'une voie de biosynthèse qui serait commune entre les peptaïbols à 19 résidus et cette série. Un phénomène, pour le moment inexpliqué, interviendrait lors de l'incorporation de l'acide aminé en 17^{ème} position par le module 17 de la NRPS.

Une étude récente sur une souche de *Trichoderma atroviride* isolée d'une éponge marine a montré également des résultats intéressants ((Panizel *et al.*, 2013). En effet, en plus de peptaïbols à 19 résidus de la famille des trichorzianines, tels ceux observés chez MMS 927, la souche produisait également des peptaïbols à 19 résidus nouveaux possédant un acide glutamique ou un acide glutamique estérifié (Glu-OMe) à la place d'une Gln, classiquement observée en position 17. Bien que jamais observé en 17^{ème} position, l'acide glutamique fait partie des acides aminés rentrant dans la composition des peptaïbols à 19 résidus (notamment en position 18). En revanche, la présence de Glu-OMe n'a jamais été décrite chez les peptaïbols à longues séquences (18-20 résidus). Cette étude soulève donc des questions sur les mécanismes mis en jeu lors de la biosynthèse de ces peptaïbols « O-méthylés ». Par analogie avec notre étude, il est intéressant de noter que cette originalité structurale est liée au résidu incorporé en position 17 pour des peptaïbols à 19 résidus produits par une souche de *Trichoderma atroviride* provenant du milieu marin.

4.4. Bilan

Suite au travail de purification des peptaïbiotiques présents dans l'extrait brut de la souche MMS 927, de nouvelles séries d'ions de peptaïbiotiques ont été découvertes. Après séquençage par spectrométrie de masse, des séquences atypiques à 17 résidus ont été partiellement élucidées, toutes caractérisées par un résidu C-terminal d'une masse moléculaire de 129 Da. Deux hypothèses de structures ont alors été formulées. Malheureusement, les analyses RMN n'ont pas pu valider ces hypothèses en raison d'un degré de pureté insuffisant des peptides analysés, ces derniers étant produits en mélange microhétérogène complexe. Différentes approches ont alors été tentées pour identifier le résidu C-terminal ou créer une réaction chimique permettant d'élucider sa structure. Les analyses sur les hydrolysats d'une fraction

prépurifiée semblaient être une voie encourageante, elles n'ont néanmoins pas permis d'élucider la structure de ce résidu. Les différentes réactions chimiques effectuées n'ont pas non plus permis d'élucider la structure du résidu C-terminal, mais elles ont montré des analogies entre la réactivité de glutamine en position 6 et du résidu C-terminal.

Pour mener à bien l'identification structurale totale de ces peptaïbiotiques et ainsi mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de leur biosynthèse, il est indispensable de poursuivre ce travail en optimisant les méthodes de purification qui permettront d'obtenir des séquences pures qui pourront alors être analysées plus facilement par RMN.

5. Discussion

Au cours de ce travail, nous avons pu mettre en évidence la présence de deux nouvelles séries de peptaïbols/peptaïbiotiques produits par des souches marines de *Trichoderma*. Les séquences modèles de ces deux séries ont été alignées avec les peptaïbols classiquement observés chez les *Trichoderma* (Figure 3-12).

Tableau 3-12 : Alignement et homologies de séquences des peptaïbols à 15 résidus et des peptaïbiotiques à 17 résidus avec les peptaïbols à 11, 14, 18, 19 et 20 résidus

Séries																								Masses moléculaires (Da)			
11 résidus	Ac	U	-	-	-	-	-	N	-	Vx	-	-	-	-	Vx	U	P	Vx	Vx	U	P	-	-	-	Vx	OH	1130 -1200
		Vx						Q	-	Lx					Lx			Lx	Lx						Lx		
14 résidus	Ac	U	-	-	-	-	-	N	-	Vx	U	P	Vx	-	Vx	U	P	U	Lx	U	P	-	-	-	Vx	OH	1380- 1480
								Q	-	Lx					Lx			J							Lx		
15 résidus	Ac	U	G	A	-	L	U	Q	U	Vx	U	-	-	A	U	-	-	-	-	U	-	U	Q	-	F	OH	1450-1520
			(A)						Vx	Vx	Lx				Vx												
17 résidus	Ac	A	A	A	-	AU	U	Q	U	U	U	-	-	A	Lx	U	P	Vx	-	U	-	Vx	[C129]	-	-	-	1600-1660
		U	(U)	(U)		U	Vx							S			Lx					Lx					
18 résidus	Ac	U	G	A	-	U	A	Q	U	A	U	-	-	G	A	U	P	L	-	U	-	U	Q	-	V	OH	1670-1850
			A	U		Vx	U	(E)	Vx	U	(A)			A	U							J		Lx			
			S			L	J			V				S	J									W			
						A				L				L										(F)			
19 résidus	Ac	U	A	U	-	A	U	Q	U	U	U	-	-	S	Lx	U	P	Vx	-	U	-	U	Q	Q	F	OH	1860-1980
			G	A		U	J			Vx				G				L				Vx		E	Lx		
			U	F		Lx								A								Lx		W			
20 résidus	Ac	U	A	G	A	U	A	Q	U	Vx	U	-	-	G	U	U	P	Vx	-	U	-	U	Q	Q	F	OH	1890-2010
			A	U		U				Lx				Vx								Vx	(E)				
			U											Lx								A					
Motifs communs à toutes les séries Motifs communs à toutes les séries sauf 11 et 14 résidus Résidu C-terminal spécifique 17 résidus Motifs caractéristiques 11 et 14 résidus Motifs caractéristiques 19 et 20 résidus Résidu spécifique 20 résidus																											

Motifs communs à toutes les séries

Motifs caractéristiques 11 et 14 résidus

Motifs communs à toutes les séries sauf 11 et 14 résidus

Motifs caractéristiques 19 et 20 résidus

Résidu C-terminal spécifique 17 résidus

Résidu spécifique 20 résidus

L'alignement des séquences montre clairement que ces deux nouvelles séries présentent plus d'homologie avec les peptaïbols longs (≥ 18 résidus) qu'avec ceux à 11 et 14 résidus.

Concernant les peptaïbiotiques à 17 résidus, nous avons déjà souligné précédemment qu'ils présentaient des séquences similaires, des positions 1 à 16, avec les peptaïbols à 19 résidus. Ils se différenciaient de ces derniers au niveau de l'incorporation du 17^{ème} résidu, dont la structure n'a pas encore pu être identifiée.

Les peptaïbols à 15 résidus ont en revanche été clairement identifiés par les analyses spectroscopiques (MS, RMN, HPLC/MS). De manière surprenante, ils ne présentent pas dans leur séquence de motifs Aib-Pro. Il s'agit de la première observation de ce type pour des peptaïbols produits par les champignons du genre *Trichoderma*. A notre connaissance, cette caractéristique a été observée une seule fois pour la peptaïboline, un peptaïbol à 5 résidus produit par un *Sepedonium* sp. (Hulsmann *et al.*, 1998). Ainsi, si l'on considère les grandes familles de peptaïbols (11, 14, 18, 19 et 20 résidus) décrites chez les *Trichoderma* sp., cette absence de proline est réellement marquante.

Ces peptides, bien que de masses moléculaires similaires à celles des peptaïbols à 14 résidus présentent peu d'homologie de séquences avec ces derniers. En effet, contrairement aux peptaïbols à 15 résidus, ceux à 14 résidus sont caractérisés par la présence de 3 motifs Aib-Pro. Une autre différence que l'on peut noter concerne le résidu C-terminal. Chez les peptaïbols à 11 et 14 résidus, caractérisés par une biosynthèse commune (Mukherjee *et al.*, 2011; Degenkolb *et al.*, 2012), l'amino-alcool C-terminal correspond généralement à un Lxxol ou Vxxol. Le Pheol C-terminal retrouvé dans cette nouvelle série est classiquement rencontré chez les peptaïbols à longue séquence et principalement ceux à 19 ou 20 résidus.

En regardant de plus près l'alignement des séquences, on peut se rendre compte que ces nouveaux peptaïbols peuvent s'aligner avec les peptaïbols à 18 résidus, plus généralement rencontrés chez l'espèce *T. harzianum*, et dont plus d'une centaine de séquences ont été décrites et référencées dans la *Comprehensive Peptaïbotics Database* (Stoppacher *et al.*, 2013; Neumann *et al.*, 2015).

Parmi ces peptaïbols, seules les trichorzines PA VI, VIII et IX (Duval *et al.*, 1998) présentent dans leur séquence un Pheol C-terminal comme c'est le cas chez les peptaïbols à 15 résidus. Les modèles de séquences des trichorzines et des peptaïbols à 15 résidus décrits dans cette étude sont comparés Tableau 3-13.

Tableau 3-13: Comparaison des modèles de séquences des peptaïbols à 15 résidus et des trichorzines

Modèle de séquences des peptaïbols à 15 résidus															
Position															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ac	U	G	A	L	U	Q	U	V	U	A	U	U	U	Q	Fol
		(A)		Lx	Vx		J	L			Vx				
							Vx	Lx							

Modèle de séquences des trichorzines																		
Position																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Ac	U	S	A	U	J	Q	U	V	U	G	L	<u>U</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	U	U	Q	Fol
				J			J											

Des homologies de séquences sont clairement observées pour certaines positions dont les résidus figurent en gras : l'Ala en position 3, la Gln en position 6 et celle C-terminale, l'Alb ou l'Iva en position 7, la Val en position 8 et les Aib en positions 9 et C-terminale. En revanche, ces séquences diffèrent d'une part aux positions 2, 4, 10, 11 et d'autre part par l'absence de trois résidus (figurant soulignés) dont le motif conservé Aib₁₂-Pro₁₃.

Une voie de biosynthèse commune entre ces deux séries relativement proches peut être supposée. En effet, par analogie avec ce qui est décrit pour les peptaïbols à 11 et 14 résidus (Mukherjee *et al.*, 2011; Degenkolb *et al.*, 2012) (Figure 3-30), un phénomène de « saut de modules » lors de la biosynthèse par la NRPS des peptaïbols à 18 résidus pourrait expliquer l'absence de 3 acides aminés et ainsi la production des peptaïbols à 15 résidus.

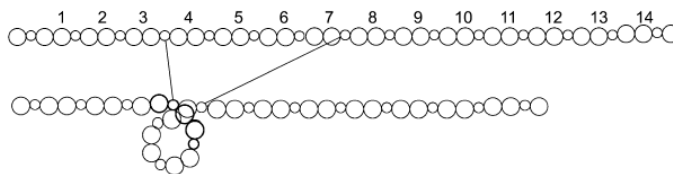


Figure 3-30: Schéma traduisant l'hypothèse de la biosynthèse des peptaïbols à 11 résidus par un phénomène de saut de module sur la NRPS des peptaïbols à 14 résidus d'après Degenkolb *et al.* (2012)

Cette observation est d'autant plus nette si l'on compare plus précisément les séquences des peptaïbols à 15 résidus avec l'ensemble des peptaïbols à 18 résidus décrits pour *T. harzianum*

(Tableau 3-14). Plusieurs hypothèses peuvent alors être émises sur les positions des résidus qui seraient concernées par ce saut de modules.

Tableau 3-14 : Comparaison des modèles de séquences des peptaïbols à 15 et 18 résidus et hypothèses de biosynthèse commune

Modèle de séquences global des peptaïbols à 18 résidus décrits chez <i>T. harzianum</i>																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Ac	U	A S G	A U (Vx)	U L Lx Vx A (J)	A U J Vx	Q	U J Vx (V) (Lx)	A U V Vx L Lx	U (A) (G)	G A (S)	U J Vx L Lx (A)	U	P	L Lx	U	U J Vx	Q	LoI Vol (Wol) (Fol)
1 ^{ère} hypothèse : absence des résidus 11 à 13																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	-	-	-	11	12	13	14	15
Ac	U	G (A)	A	L Lx	U Vx	Q	U J Vx	V L Lx	U	A	J Vx L Lx (A) <u>11</u>	U	P	U Vx	U	U	Q	Fol
<u>12</u> <u>13</u> 14 15 16 17 18																		
2 ^{ème} hypothèse : absence des résidus 12 à 14																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	-	-	-	12	13	14	15
Ac	U	G (A)	A	L Lx	U Vx	Q	U J Vx	V L Lx	U	A	U Vx	U	P	L Lx <u>12</u> <u>13</u> <u>14</u>	U	U	Q	Fol
15 16 17 18																		
3 ^{ème} hypothèse : absence des résidus 13 à 15																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	-	-	-	13	14	15
Ac	U	G (A)	A	L Lx	U Vx	Q	U J Vx	V L Lx	U	A	U Vx	U	P	L Lx <u>13</u> <u>14</u> <u>15</u>	U	U	Q	Fol
16 17 18																		

Les alignements de séquences font ressortir trois hypothèses qui pourraient expliquer la biosynthèse de cette nouvelle série de peptaïbols avec l'absence d'un segment de trois résidus contenant une proline et pouvant se situer des positions 11 à 15 (figurant en gras). La première hypothèse suggère que « l'erreur » de biosynthèse interviendrait au moment de l'incorporation

des acides aminés 11 à 13 par les modules respectifs soit l'absence d'un segment $[J/Vx/L/Lx]_{11-U_{12}-P_{13}}$. Les peptaïbols putatifs à 18 résidus ainsi obtenus montreraient toutefois un mauvais alignement au niveau de la position 14 (Aib/Vxx au lieu de Leu/Lxx normalement observé). La deuxième hypothèse liée à la délétion du segment $U_{12}-P_{13}-[L/Lx]_{14}$ semble assez logique si l'on considère les séquences possibles obtenues qui s'aligneraient mieux avec les séquences décrites et notamment l'Aib retrouvé de manière constante en position 15 et la variabilité de la position 11 (Aib/Vxx). Ce même type de délétion (U-P-X) serait à l'origine de la biosynthèse des peptaïbols à 11 résidus par des NRPS à 14 modules normalement responsables de la synthèse de peptaïbols à 14 résidus (Mukherjee *et al.*, 2011). La dernière hypothèse concernerait la délétion du segment $P_{13}-[L/Lx]_{14}-U_{15}$. Les séquences envisageables s'aligneraient en position 12 avec la présence constante d'un Aib. Par contre, l'Aib₁₃ constant chez les peptaïbols à 15 résidus occuperait alors une position 16 normalement plus variable chez les peptaïbols à 18 résidus (Aib, Iva, Vxx).

Ces comparaisons de séquences suggèrent ainsi clairement que la biosynthèse de cette nouvelle série semble liée à celle des peptaïbols à 18 résidus rencontrés chez *T. harzianum*. Il est toutefois intéressant de noter que, quelle que soit l'hypothèse retenue, les séquences « reconstruites » de peptaïbols à 18 résidus avec notamment un Pheol C-terminal et une Gly₂ ne correspondent à aucune séquence encore décrite dans la littérature, toute espèce fongique confondue. L'étude de leur voie de biosynthèse se révèle d'autant plus intéressante.

6. Conclusion du chapitre

En guise de conclusion il est important de rappeler que le point commun entre ces deux nouvelles séries de peptaïbols/peptaïbiotiques réside dans leur originalité structurale liée à leur biosynthèse par les NRPS. Autant celle des peptaïbols à 15 résidus pourrait s'expliquer par trois acides aminés qui ne seraient pas incorporés par une NRPS de 18 modules, comme c'est le cas pour les peptaïbols à 11 résidus, autant celle des peptaïbiotiques à 17 résidus reste inexpliquée du fait de l'incorporation du 17^{ème} résidu.

La mise en évidence de ces séries originales de peptaïbols/peptaïbiotiques soulève ainsi des questions sur les mécanismes mis en jeu lors de leur biosynthèse. Ainsi, chez *T. harzianum* MMS 1255, est-ce bien une NRPS à 18 modules qui serait responsable de la biosynthèse des peptaïbols à 15 résidus ou plutôt une NRPS à 15 modules ? Chez *T. atroviride* MMS 927, quel phénomène intervenant au niveau de l'incorporation du 17^{ème} résidu par le 17^{ème} module de la NRPS pourrait expliquer la formation de ces peptides ? Une approche génomique qui consisterait à rechercher et à identifier les gènes codant les NRPS responsables de leur biosynthèse devrait permettre de répondre à ces questions.

Chapitre 4 : Valorisation des peptaïbols et des *Trichoderma* marins en biocontrôle

1. Contexte

L'agriculture doit produire des produits sains et de qualité en quantité toujours croissante. Pour y parvenir, des molécules diverses ont été développées, tels que des pesticides synthétiques, afin de lutter contre les phytopathogènes.

Malheureusement, l'utilisation de ces molécules peut entraîner une pollution des eaux de surface et souterraines, la destruction d'habitats naturels et par conséquent une diminution de la biodiversité. De plus, une utilisation excessive de ces produits pourrait également affecter la santé des consommateurs (Martenies and Perry, 2013). À titre d'exemple (Canal-Raffin *et al.*, 2008) ont mis en évidence des effets cytotoxiques du fongicide folpet (ou folpel) sur des cellules épithéliales bronchiales. De plus, des effets neurotoxiques ont été décrits par (Jokanovic and Kosanovic, 2010): troubles de l'humeur, difficulté de concentration, troubles de langage, détérioration de l'écriture... Ce qui a entraîné la publication d'une fiche toxicologique (num. 281) par l'INRS sur ce pesticide.

De plus, l'abus de pesticides tels que les benzimidazoles, dicarboximides, carbamates, triazoles, fludioxonil ou azoxystrobin peut mener à l'apparition de résistances chez les pathogènes et la perte d'efficacité du traitement. Ainsi, plusieurs études ont décrit une résistance aux fongicides des phytopathogènes fongiques comme *Alternaria brassicicola* et *Botrytis cinerea*, deux champignons causant des dégâts sérieux aux récoltes (Cooke *et al.*, 1997; Sigareva and Earle, 1999; Cramer and Lawrence, 2004; Elad *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2007).

C'est pourquoi aujourd'hui, les agriculteurs doivent protéger leurs cultures tout en diminuant leur consommation de pesticides. Dans le cadre du plan Ecophyto, l'Europe a fixé un objectif de réduction de moitié de l'utilisation des pesticides d'ici 2018.

Différentes alternatives aux traitements chimiques ont été proposées. C'est en particulier le cas du contrôle biologique qui consiste en l'utilisation d'agents biologiques pour prévenir certaines maladies chez les plantes. Ainsi, des études ont montré que des champignons du genre *Trichoderma* pouvaient inhiber ou réduire la présence de phytopathogènes fongiques tels que les *Fusarium*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Verticillium* ou *Botrytis* sur les plantes (Benitez *et al.*, 2004;

Lorito *et al.*, 2010; Vos *et al.*, 2014) et différentes souches de *Trichoderma* sp. d'origine terrestre sont déjà commercialisées pour cette utilisation comme agents de contrôle biologique (BCAs) (Degenkolb *et al.*, 2015) dans des formulations telles que *Triatum*®, *Esquive WP*® ou *Bioorganic plus*®. Les champignons du genre *Trichoderma* représentent en effet un intérêt pour le biocontrôle car ils possèdent quatre modes d'action: le parasitisme, l'antibiose, la compétition et la stimulation des défenses des plantes. Leurs activités biologiques dans ces domaines pourraient également être liées à leur production de métabolites antifongiques. Ainsi, l'hypothèse d'une relation entre l'effet antagoniste des souches de *Trichoderma* et leur production de peptaïbols a été posée (Wiest *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2012).

Très peu d'études ont été réalisées dans le domaine du biocontrôle sur des champignons marins, mais tout suggère que l'écosystème marin puisse représenter une source significative de nouveaux agents de biocontrôle (Gal-Hemed *et al.*, 2011). En effet, cet environnement contient une biodiversité microbienne très riche, synthétisant des molécules avec des propriétés biologiques variées. En outre, bien que l'on suppose que de nombreux champignons marins aient une origine terrestre, ils semblent s'être parfaitement acclimatés à l'environnement marin.

Dans ce contexte, le laboratoire a proposé, dans le cadre du projet NABUCO (proposé dans le cadre du plan ECOPHYTO), de rechercher dans sa mycothèque marine des souches pouvant présenter un intérêt comme agents de lutte contre les phytopathogènes. Cette collection comprend en effet de nombreuses souches de champignons du genre *Trichoderma*, qui représente à lui seul plus de 10 % des souches fongiques isolées en zones côtières aquacoles. De plus, la majorité de ces souches marines de *Trichoderma* sont productrices de peptaïbols.

L'objectif de cette partie est de rechercher si les *Trichoderma* marins peuvent être de bons candidats pour être des agents de biocontrôle, de mieux comprendre le rôle joué par les peptaïbols dans leur activité anti-phytopathogène et de rechercher si d'autres métabolites fongiques peuvent être impliqués dans l'activité des *Trichoderma* étudiés.

2. Matériel et méthodes liés au chapitre

2.1. Souches fongiques phytopathogènes

Deux souches de champignons phytopathogènes ont été utilisées dans ce chapitre :

- ***Botrytis cinerea* (IRHS-28S)** : cette souche a été isolée de culture de vigne par le laboratoire UMR bioger (INRA)

- ***Alternaria brassicicola* (IRHS-Abra43)** : la souche utilisée est la souche de référence du laboratoire Fungisem d'Angers. Elle a été isolée sur des graines de radis dans le département du Lot et Garonne en 1999.

2.2. Mesure de la croissance fongique par néphélométrie

La néphélométrie laser est une méthode directe de mesure de la teneur de particules en suspension ou de la turbidité d'un milieu. Elle est basée sur la diffusion de la lumière par les particules en solution. La néphélométrie laser consiste en effet à mesurer la lumière diffusée à un angle de 90° par rapport à un faisceau incident (Figure 4-1). La lumière diffusée est directement proportionnelle à la concentration de particules en suspension. Les résultats des mesures sont exprimés en unité néphélométriques relatives (RNU).

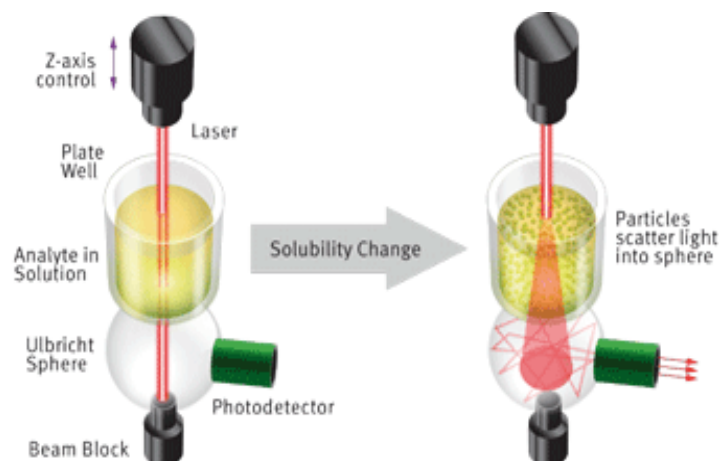


Figure 4-1 : Principe de la néphélométrie laser

Cette technique permet la mesure directe de la croissance microbienne ou fongique, en particulier pour les champignons filamenteux (Joubert *et al.*, 2010). Dans le cas de la présente

étude, les analytes à tester (peptaïbols) sont ajoutés à différentes concentrations à des suspensions de spores des deux champignons phytopathogènes à étudier dans des plaques à 96 puits. L'ensemble est mis à incuber à 25 °C et une mesure par néphélométrie est réalisée automatiquement sur chaque puits toutes les heures pendant 33 h, la plaque étant agitée régulièrement (cf. publication 2).

2.3. Inhibition de la croissance des phytopathogènes en co-cultures

Afin d'évaluer le pouvoir antagoniste de souches de *Trichoderma* vis-à-vis des phytopathogènes étudiés, des co-cultures sur milieux PDA sont réalisées suivant le schéma (Figure 4-2). Les cultures sont suivies pendant 12 jours et les diamètres de pousse des deux souches sont mesurés quotidiennement.

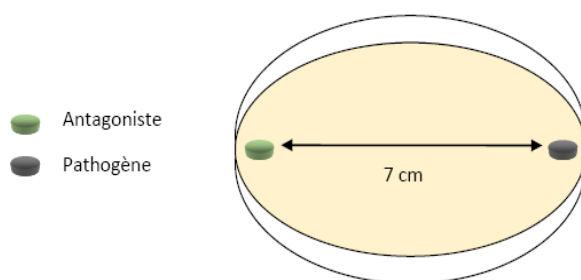


Figure 4-2 : Schéma de confrontation antagoniste-pathogène

Ces relevés de mesures permettent de déterminer un pourcentage d'inhibition de croissance du phytopathogène par le champignon antagoniste en comparant sa pousse à celle d'une culture de ce champignon seul.

2.4. Etude *in planta*

Afin d'étudier le pouvoir protecteur des peptaïbols *in planta* vis-à-vis des phytopathogènes, des feuilles de choux de la variété Bartolo ont été inoculées avec des suspensions de conidies d'*A. brassicicola*. Une solution de peptaïbols a été appliquée à la moitié des feuilles ainsi inoculées. Les plantes sont remises à pousser et les symptômes observés sont suivis par prises de photographies et une comparaison entre feuilles traitées et non-traitées a été réalisée.

2.5. Etude de la production de métabolites par les souches en co-cultures (*partie non-incluse dans la publication*)

Le protocole suivi dans cette partie a été inspiré par les travaux menés par Bertrand *et al.* en 2014 (Bertrand *et al.*, 2014). Afin d'étudier la production et l'excrétion de métabolites particuliers par les souches pathogènes et antagonistes lorsqu'elles sont en présence les unes des autres, les souches étudiées ont été cultivées seules ou en confrontation sur des boîtes de Petri de 10 cm de diamètre en 6 répliquas sur milieu PDA préparé avec de l'eau distillée (pour se rapprocher des conditions d'application en biocontrôle). Une série de cultures est lancée pour effectuer des prélèvements à 3 jours de pousse (avant contact) pathogène-antagoniste. Les prélèvements sont effectués en périphérie du développement des cultures pour connaître la diffusion des métabolites dans le milieu de culture. La biomasse est également prélevée afin de connaître la production directe de métabolites non-excrétés dans le milieu. Les mono-cultures des champignons permettront de différencier les métabolites produits par chaque champignon et de repérer les métabolites supplémentaires induits lors des cultures en confrontation. Les schémas des cultures et prélèvements sont donnés ci-dessous (Figure 4-3).

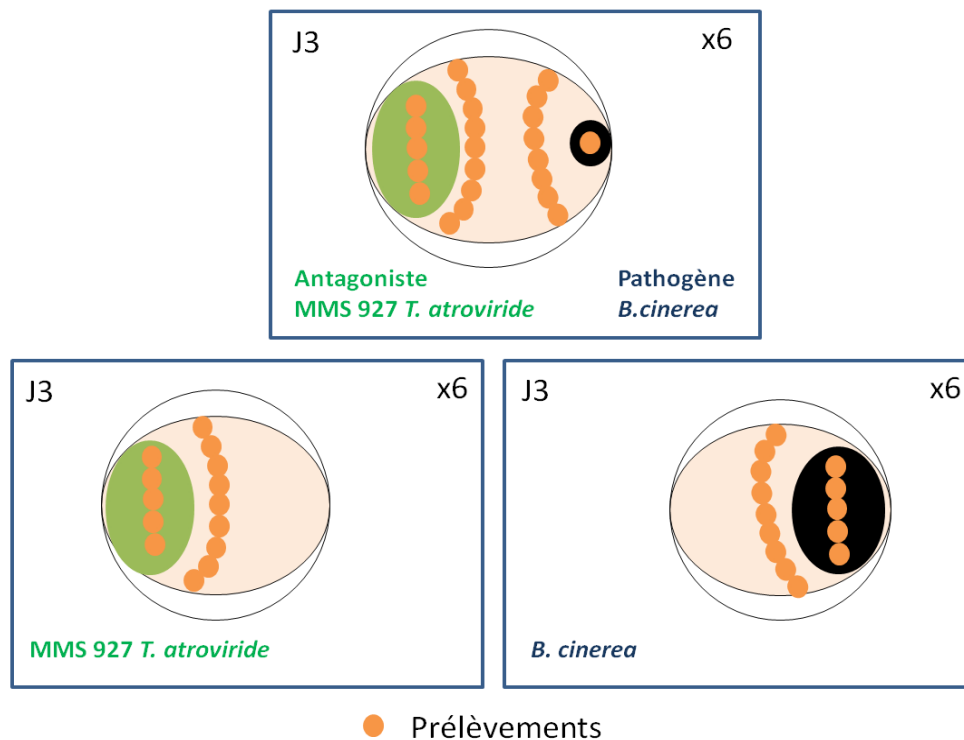


Figure 4-3 : Protocole de culture et co-culture *Botrytis cinerea*-*Trichoderma* et prélèvements

2.5.1. Extraction de la biomasse

Les différents prélèvements sont mis à macérer dans des tubes à essais lavés et rincés à l'EtOH dans 3 mL d'un mélange MeOH/AcOEt/Dichlorométhane (1:3:2, v/v) dans un bain à ultrasons pendant 1 h. Le mélange de solvant contenant les métabolites extraits est ensuite séparé de la gélose par filtration sur membrane nylon (UptiDisc™ 0,45 µm, Interchim, France). Le filtrat est ensuite évaporé puis repris dans 1 mL de MeOH de qualité UHPLC (chromatographie liquide ultra haute pression) avant l'analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (HR-MS).

2.5.2. Analyse et détection des métabolites

L'analyse et la détection des métabolites se fait sur une chaîne HPLC (UFLC, Shimadzu, Kyoto, Japon) couplée au spectromètre de masse haute résolution hybride ESI-IT-TOFMS (Shimadzu, Kyoto, Japon) (cf. Chapitre 2). La chaîne HPLC est composée de deux pompes LC-20ADxr, d'un injecteur automatique SIL20ACxr, d'un four à colonne CTO-20AC, d'un détecteur UV à barrettes de diodes SPD-M20A PDA et d'un système contrôleur CBM-20A. La colonne utilisée est une

Kinetec C₁₈ 100 Å (2,6 µm, 150 x 2,1 mm) thermostatée à 40°C. L'élution des composés est assurée par un gradient (Tableau 4-1) et la phase mobile est constituée d'un mélange des solvants acétonitrile acidifié avec de l'acide formique et eau acidifiée à l'acide formique (ACN + 0,1% AF/ H₂O + 0,1% AF) à un débit de 0,3 mL/min. La méthode d'analyse utilise le mode d'ionisation positif et négatif avec une acquisition HR-MS des rapports *m/z* compris entre 100 et 1500. Les paramètres d'analyses sont les suivants: la température du bloc de chaleur et de la ligne de désolvatation sont fixés à 200°C avec un flux d'azote de nébulisation à un débit de 1,5 L/min, le voltage de l'interface est fixé à +4,5 kV et -3,5kV et la tension du détecteur à 1,6 kV. Seuls les résultats obtenus en mode positif ont été exploités dans ce manuscrit.

Tableau 4-1 : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse par HPLC-HRMS

Temps (min)	ACN + 0,1% AF	H ₂ O + 0,1% AF
0-2	15	85
25	100	0
30	100	0
31	15	85
35	15	85

Les pic chromatographiques élués aux temps de rétention (RT) inférieurs à 1 min sont considérés comme faisant partie du pic d'injection et ne seront donc pas pris en compte. Au dessus de 30 min, le gradient d'élution correspond à la phase de rinçage, les pics chromatographiques ayant un temps de rétention supérieur, ne sont également pas pris en compte.

2.5.3. Détection automatique des ions

Il est nécessaire de retraiter les données brutes HR-MS avec le logiciel MZmine 2® (Pluskal *et al.*, 2010)Pluskal, 2012 #1148} afin de sélectionner les ions d'intérêt. La détection automatique a été exécutée entre 0 et 35 min avec le logiciel MZmine 2® en utilisant des paramètres de détection adaptés à l'appareil utilisé pour effectuer les analyses HPLC-HRMS. Les ions détectés sur une zone d'une largeur d'au moins 0,03 s et avec une intensité supérieure à 20000 ont été choisis avec 30 ppm de tolérance sur le rapport *m/z*. La liste d'ions ainsi générée a été déconvoluée. Un filtrage des isotopes a été appliqué en utilisant le module "isotopic peak grouper" avec des paramètres de tolérance ajustés à 0,03 s et 30 ppm. L'Alignement des ions et

le remplissage des lacunes (« gap-filling ») ont été réalisés avec une tolérance de 30 ppm pour le rapport m/z et de 0,3 min pour le temps de rétention. Les ions détectés dans l'échantillon blanc et dans l'échantillon de milieu de culture non-inoculé ont été retirés de la matrice ainsi générée contenant les caractéristiques des ions détectés (m/z , RT) et leurs aires correspondantes dans chacun des échantillons.

2.5.4. Traitement statistique

De simples scripts Excel® ont été employés pour traiter le nombre important de données produites de façon univariée. Pour repérer les ions induits ou réprimés, l'aire sous pic de chaque ion a été le critère de sélection. En effet, l'aire déterminée dans les échantillons de co-culture doit être au moins 3 fois supérieure ou inférieure à 1/3 de celle mesurée dans la mono-culture, pour considérer les ions respectivement comme induits ou réprimés. La variation de présence ainsi mesurée est caractérisée par le rapport de l'aire d'un ion observé dans les échantillons de co-culture sur l'aire du même ion observé dans les échantillons de monoculture et est appelée « fold change ». La significativité statistique (p -value) des ions mis en évidence a été validée par le test de Student pour comparer chaque ion de la mono-culture au même ion en co-culture. Elle est déterminée par la présence de cet ion dans le plus grand nombre d'échantillons d'un groupe. Seuls les ions ayant une p -value inférieure à 0,05 et un « fold change » supérieur à 3 ou inférieur à 1/3 sont considérés comme valides (Hur *et al.*, 2013). Le traitement statistique des données d'analyse métabolomique par spectrométrie de masse se visualise par la construction de graphes en volcan. Ces graphiques représentent la significativité statistiques (p -value) des ions en fonction de la variation de leur aire sous pic (« fold change ») entre les mono-cultures et les co-cultures. Si le « fold change » est supérieur à 1 pour un ion donné correspondant à une molécule, on parle de métabolite induit et s'il est inférieur à 1, de métabolite réprimé. Plus sa valeur est distante de 1, plus la variation d'intensité de l'ion ciblé entre les 2 groupes d'échantillons est importante.

2.5.5. Identification des composés d'intérêt

Les formules brutes correspondantes aux ions sélectionnés par les étapes précédentes ont été déterminées grâce au logiciel MZmine 2® (Pluskal *et al.*, 2010). Le choix a été fait de se focaliser

sur certains adduits pouvant principalement être générés dans les conditions d'analyse : $[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$, $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$. La détermination des formules brutes s'effectue grâce à la précision de la masse (m/z) et des spectres mesurés (similitude de profils isotopique). Afin de réduire le nombre des formules brutes possibles, plusieurs filtres heuristiques peuvent être employés : i) la restriction du nombre d'éléments chimiques; ii) l'application des règles chimiques de LEWIS et SENIORS; iii) la corrélation avec les modèles isotopiques; iv) les ratios hydrogènes/carbones; v) les ratios élémentaires d'azote, d'oxygène, de phosphore et de soufres/carbones (Kind and Fiehn, 2007; Pluskal *et al.*, 2012).

Les différentes formules brutes ont ensuite été recherchées dans des bases de données telles que DNP (Dictionary of Natural Products, DNP 24.2 Copyright © 2016 Taylor & Francis Group) ou Sci-finder (Copyright © 2016 American Chemical Society) afin d'identifier les composés. Seuls ceux correspondant à des molécules décrites pour les champignons étudiés (*Trichoderma* et *Botrytis*) ont été considérés comme probablement identifiés (Bertrand *et al.*, 2014). Les identifications ainsi proposées ne restent que putatives, ce qui correspondrait au niveau 3 (identifié sans certitude grâce uniquement à une donnée MS¹) de l'échelle d'identification proposé par le MSI (Metabolomic Standard Initiative) (Creek *et al.*, 2014).

3. Etude de l'activité anti-phytopathogène des peptaïbols et de souches marines de *Trichoderma* sp.

Dans cette partie, l'activité antifongique des principales classes de peptaïbols a été testée vis à vis de deux champignons phytopathogènes : ***Alternaria brassicicola***, agent de la maladie des taches noires affectant spécifiquement les plantes de la famille des Brassicacées (Calmes, 2011), et ***Botrytis cinerea***, champignon nécrotrophe responsable de la pourriture grise d'un grand nombre de plantes économiquement importantes telles que la vigne, le tournesol, la tomate ou la fraise. Cette étude a été réalisée *in vitro* par suivi de la croissance de souches phytopathogènes par néphélométrie LASER en présence de peptaïbols purifiés de différentes longueurs. Les conclusions de cette étude ont permis de sélectionner une souche de la mycothèque pour laquelle le pouvoir inhibant sur les phytopathogène a été étudié par des co-

cultures réunissant ce *Trichoderma* et les phytopathogènes. Son activité a été comparée à celle d'une souche commerciale de *Trichoderma* utilisée en biocontrôle. Enfin l'efficacité antifongique *in planta* des peptaïbols produits par cette souche marine a été testée pour la protection du chou contre *A. brassicicola*.

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude a donné lieu à la rédaction d'une publication présentée dans les pages suivantes (actuellement en préparation). Nous rappellerons néanmoins les principaux résultats obtenus à la suite du texte de cet article.

3.1. Souches marines de *Trichoderma*, source potentielle d'agents de biocontrôle - publication 2 (en préparation)

Le texte du manuscrit en préparation est présenté dans les pages suivantes.

Marine derived *Trichoderma* as a potential source of biocontrol agents

Anne-Isaline Van Bohemen¹, Nicolas Ruiz¹, Aurore Zalouk-Vernoux¹, Thibaut Robiou du Pont¹, Marie-Claude Boumard¹, Yann Renaux², Philippe Simoneau², Yves François Pouchus^{1*}, Thomas Guillemette²

¹University of Nantes, MMS EA 2160, 44000 Nantes, France

²University of Angers, IRHS UMR 1345, SFR 4207 QUASAV, 49000 Angers, France

*Correspondance: Email: yves-francois.pouchus@univ-nantes.fr

Abstract

Biological control agents (BCAs) represent an alternative to pesticides for plant protection. Different terrestrial strains of *Trichoderma* sp. are already used for that purpose. Several of these commercially available strains have been described to produce peptaibols, linear non-ribosomal antimicrobial peptides which are presumed to play a role in the biocontrol activity of *Trichoderma* spp.. In order to evaluate the importance of the peptaibol production profile for the selection of marine *Trichoderma* strains for a use as antifungal agents, the four main peptaibol series (11-, 14-, 18- and 20-residues) were assayed on *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea* cultures to evaluate the influence of the chain-length on the activity. Peptaibols were purified from marine-derived *Trichoderma* cultures and tested in microscale liquid cultivation using automated nephelometric analyses. Long chain peptaibols (> 17 -res) exhibited a significant antifungal activity against both phytopathogens. On the opposite short peptaibols (< 15-res) were inactive or exhibited a very low activity at the tested concentrations. As the criterion of production of long peptaibols seemed essential, a marine *Trichoderma* strain producing only this kind of peptaibols was chosen for further investigations. Its bioactivity towards phytopathogens was compared to that of a commercial BCA strain and was found equivalent. After purification, its peptaibols (19-res) were assayed in-planta against *A. brassicicola* on *Brassica* sp. leaves and exhibited an inhibition of the pathogen.

Keywords: peptaibols; antifungal activity; biological control; *Botrytis cinerea*; *Alternaria brassicicola*; marine-derived *Trichoderma*

Introduction

Agriculture must produce safe and quality products in increasing quantities. To achieve this, various molecules have been developed to control phytopathogens such as synthetic pesticides. However, an excessive use of these products could affect the health of consumers (Martenies and Perry, 2013). Furthermore, abuse of pesticides may lead to the emergence of pathogen resistances and loss of treatment efficiency. Thus, several studies have described a resistance to fungicides of fungal phytopathogens such as *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*, both fungi causing serious damage to crops (Cooke *et al.*, 1997;

Sigareva and Earle, 1999; Cramer and Lawrence, 2004; Elad *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2007). Different alternatives to chemical treatments have been proposed such as biological control. In this way, fungi of the genus *Trichoderma* have been mentioned to be able to inhibit or reduce the occurrence of fungal phytopathogens like *Fusarium*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Verticillium* or *Botrytis* sp. (Benitez *et al.*, 2004; Lorito *et al.*, 2010; Vos *et al.*, 2014). Different *Trichoderma* strains are already marketed for this use as biological control agents (BCAs) (Degenkolb *et al.*, 2015). Their bioactivity in this domain has been supposed to be linked with the production of antifungal metabolites. Particularly, a relationship between the antagonistic effect of *Trichoderma* strains and their production of peptaibols had been proposed (Wiest *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2012). Peptaibols are small linear non-ribosomal peptides containing up to 20 amino acid residues characterized by an acetylated N-terminus, a C-terminus amino acid reduced into an amino alcohol and a high proportion of non-proteinogenic amino acids such as α -aminoisobutyric acid (Aib) or isovaline (Iva). Peptaibols are generally produced in microheterogeneous mixtures (Brückner and Przybylski, 1984; Reiber *et al.*, 2003) by fungi belonging to the genus *Trichoderma* and some related genera. They represent the most abundant subgroup of the non-ribosomal peptide antibiotic group called peptaibiotics (Degenkolb *et al.*, 2008; Degenkolb *et al.*, 2008). According to their chain-length, peptaibols produced by *Trichoderma* species can be divided in five main families of 11-, 14-, 18-, 19- and 20-residues (-res) respectively. Identified-ones are compiled in the *Comprehensive Peptaibiotics Database* (Stoppacher *et al.*, 2013; Neumann *et al.*, 2015). In order to confirm the putative role of peptaibols in *Trichoderma* antifungal activity and to evaluate the influence of their chain-length on this activity, microheterogeneous mixtures of peptaibols belonging to the four most-frequent families (11-, 14-, 18- and 20-res) were purified from marine-derived *Trichoderma* strain cultures and assayed against two fungal phytopathogens *A. brassicicola* and *B. cinerea* *in-vitro*. A second comparison of antifungal activity was conducted with a marine-derived *Trichoderma* strain and a commercial *Trichoderma* BCA strain versus the two previous pathogens. Then, the 19-residue peptaibols purified from this last bioactive marine-derived *Trichoderma* strain were assayed *in planta* against *A. brassicicola*.

Material and methods

Chemicals

Dichloromethane (CH_2Cl_2) and methanol (MeOH) used for peptaibol extraction and purification were purchased from Carlo Erba and distilled prior to use; ethanol (EtOH; APC 99.8%) used for Vacuum Liquid Chromatography (VLC) was purchased from Carlo Erba; MeOH of HPLC quality grade used for mass spectrometry (MS) analyses was purchased from Biosolve (Dieuze, France). Water was purified by a Milli-Q system (MILLIPORE, Bedford, MA, USA).

Fungal strains

For peptaibol production, different marine-derived strains of *Trichoderma* sp. were used: *T. citrinoviride* MMS19 for 20-residue (20-res) peptaibols, *T. harzianum* MMS1255 for 11- and 14-res peptaibols, *T. pleuroticola* MMS 1512 for 18-res peptaibols. Strain *T. atroviride* MMS927 was used for its 19-res peptaibol

production. All these strains are stored in the marine-derived fungal strain collection of the MMS laboratory. They were identified by sequencing their internal transcribed spacer (ITS) regions (Genbank accession numbers JQ608473, JQ653081, JQ653084 and GU947796, respectively).

For assay against phytopathogens two *Trichoderma* strains were assayed, the marine *Trichoderma atroviride* MMS927) and the commercial *T. harzianum* T22® (ATCC 20847) (Kopert BV, Berkel en Rodenrijs, Netherlands) against two phytopathogens, *Botrytis cinerea* (IRHS-28S) which has been isolated from vine crop by the laboratory UMR Bioger (INRA) and *Alternaria brassicicola* (IRHS-Abra43) isolated from radish seeds in the French county of Lot et Garonne in 1999. These strains are stored in the laboratory collection of the IRHS laboratory.

Cultures and fermentation of *Trichoderma* strains

The *Trichoderma* strains were inoculated onto Petri dishes (20-cm diameter) containing 125 ml of marine DCA (dextrose casein agar) medium. Cultures were incubated under natural light for 11 days at 27°C prior to harvesting for biomass extraction, as previously described (Carroux *et al.*, 2013).

Isolation and purification of peptaibols

After incubation, the harvested biomass was steeped twice in CH₂Cl₂/MeOH 1:2 then 2:1 (1200 ml each, v/v) for 2 h at room temperature. Combined extracts were filtered, washed with distilled H₂O (600 ml) and evaporated to dryness to provide a crude extract which was partitioned in aliquots and fractionated by repetitive VLC on a Diol column (Chromabond (OH)2; 10 × 50 mm, 60 Å, 45 µm, Macherey-Nagel, Düren, Germany), with successive CH₂Cl₂/EtOH mixtures 98:2, 95:5, 92:8, 90:10 and 85:15 (v/v). Peptide-containing fractions (CH₂Cl₂/EtOH 90:10, v/v) were subjected to a liquid chromatography on an open silica gel column (Chromagel, 200 × 20 mm, 60Å, 35-70 µm, SDS, Peypin, France), with CH₂Cl₂/MeOH mixtures (95:5 to 80:20, v/v). Peptaibols were eluted in CH₂Cl₂/MeOH mixture 85:15 (v/v). The above fractions were purified by HPLC (Agilent 1050) on a preparative reversed phase column (Inertsil ODS-3 RP18, 10 × 250 mm, 5 µm, Interchim, Montluçon, France). Mobile phase (MeOH/H₂O 85:15, v/v) was delivered at a constant flow rate of 5 ml/min. UV-detection was performed at 230 nm. All data were acquired by HP ChemStation for LC.

Mass spectrometry analyses

Mass analyses were carried out using a LCQ™ electrospray ionization ion-trap MS instrument (ESI-IT/MS) (Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA) in positive-ionization mode. Peptaibol-containing fractions were infused as MeOH solutions (0.5 µg/ml) with a 250-µl micrometrically automated syringe (Hamilton, F-Massy) at a flow rate of 3 µl/min. All spectra were acquired and analyzed by LCQ Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific). Total current-ion mass spectra in fullscan mode were acquired in the *m/z* range of 150 to 2000. Charge state and isotopic distribution were analyzed by a narrow-scan range mode (zoomscan mode).

Activity on fungal phytopathogens (naphelometry)

Tests were performed on microscale liquid cultivation using automated nephelometric analyses (Joubert *et al.*, 2010). Conidia of filamentous fungi *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea* were collected by scrapping on 10-day solid culture plates, microscopically counted and diluted in PDB (Potato Dextrose Broth) medium to give a final concentration of 1×10^6 cells/mL. Methanolic solutions at 5.0, 2.5, 1.25 and 0.5 mg/mL were prepared for each series of peptaibols tested. Samples were prepared with 890 μ L of culture broth, 100 μ L of conidia suspension and 10 μ L of the peptaibol solutions leading to final peptaibol concentrations of 50, 25, 12.5 and 5 μ g/mL. Samples were incubated during 33 h and the fungal growth was automatically recorded at 25°C under 200 rpm agitation during 5 min every 10 min on a laser nephelometer (NEPHELOstar Galaxy, BMG Labtech, Offenburg, Germany) equipped with a 635-nm laser as radiation source. All data were obtained from three independent biological repetitions, each of them based on three technical replicates. Results were expressed in relative nephelometric units (RNU).

Statistical analysis

ANOVA were used to compare the antagonistic activity of a peptaibol series with the others and with the negative control.

The *t*-test of Student was used to compare the growth of the pathogenic fungi for each incubation time of the experiment (during 33 h) between the different treatments with the peptaibol series and the negative control.

All statistical tests were realized with XLStat®.

Fungal confrontation

To evaluate the antagonism between *Trichoderma* strains and *B. cinerea* or *A. brassicicola*, 8-mm diameter discs of PDA (Potato Dextrose Agar) medium were taken from the edge of actively growing colonies of fresh fungal cultures, and placed on the surface of a fresh PDA plate at a spacing of 7 cm. *Trichoderma* strains were grown in dual cultures against each pathogen. Single cultures of each fungus were also realized. All fungi were inoculated at the same time for a period of twelve days at 24°C. The growth diameters were measured each day and compared to those of control dishes. The percent inhibition of mycelial growth of pathogen was calculated according to formula (1) suggested by Watanabe in 1984 (Watanabe, 1984):

$$(1) \text{ growth inhibition in \%} = [(C-T)/C] \times 100$$

where, C = colony diameter of pathogen in control plate (pathogen alone) and T = colony diameter of pathogen in test plate (confrontation)

Assay on Brassica leaves

Cabbages (*Brassica oleracea*) grown during a couple of week were used. Conidia suspensions of *A. brassicicola* were prepared at 3 different concentrations: 10^5 , 10^4 and 10^3 conidia/mL. Control solutions were prepared without peptaibol and the treatment solutions contained 19-res peptaibols at 50 μ g/mL. Ten 5

µL drops of each solution were deposited on leaflets (three replicates of each concentration). Then, plants were grown in mini-greenhouses. Pictures were taken since the appearance of the first symptoms. The sizes of the lesions on treated leaflets were compared with control ones.

Results

Preparation and analysis of 11-, 14-, 18- and 20-res peptaibol mixtures

In order to determine the antifungal activity of the different classes of peptaibols, the first step of the study consisted in the preparation of purified microheterogeneous mixtures of the main peptaibol families with length ranging from 11 to 20 residues. Peptaibols were isolated from cultures of different *Trichoderma* strains selected in the marine-derived strain collection of the laboratory according to their peptidic productions. Crude extracts were subjected to different fractionation steps leading to enriched peptaibols extracts which were analyzed by mass spectrometry (MS) (supplementary data – Fig. S1). These enriched extracts were then purified leading to 11-, 14-, 18- or 20-res peptaibols in microheterogeneous mixtures. The compositions of obtained mixtures were determined and their main components were sequenced by MS analysis (supplementary data – Fig. S2). Purified peptaibols were found to be analogous to known peptidic families. Eleven residue peptaibols were chemically similar to trichobrachins (Krause *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2007), hypojecorins A (Degenkolb *et al.*, 2012) or Tv29-11 sequences (Mukherjee *et al.*, 2012). Fourteen residue peptaibols were closely related to Tv29-14 or harzianins HC (Rebuffat *et al.*, 1995). Eighteen residue peptaibols exhibited same MS profiles than trichokindins isolated from *T. harzianum* (Iida *et al.*, 1994). Twenty residue peptaibols were in accordance with peptaibols produced by a *T. citrinoviride* strain isolated from a cork oak (Maddau *et al.*, 2009).

Antifungal activity of 11-, 14-, 18- and 20-res peptaibol mixtures.

The four purified peptaibol mixtures were assayed for their antifungal activity towards two phytopathogenic fungi *A. brassicicola* and *B. cinerea* at four different concentrations. After 33 h of incubation, growth inhibition percentages were calculated for the different peptaibol series using untreated cultures as control (Fig. 1).

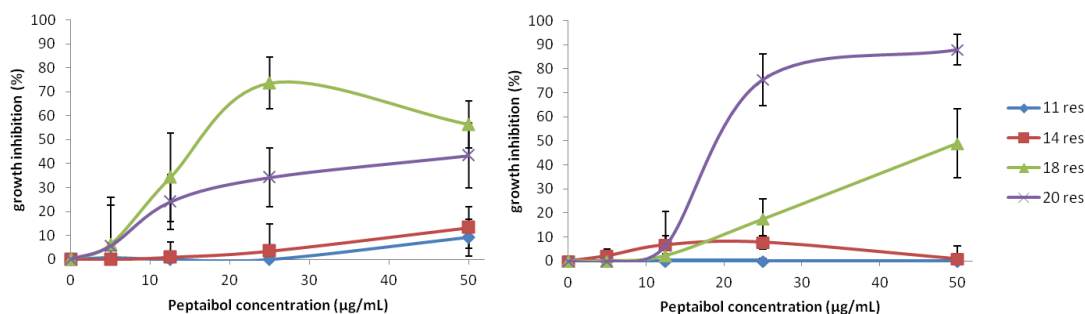


Figure 1. Antifungal activity of 11-, 14-, 18- and 20-res peptaibol mixtures after 33 h of incubation.

A) Inhibition of *A. brassicicola*. B) Inhibition of *B. cinerea*. Data are shown as mean $\pm$ SD (n=3)

At the concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$ all peptaibol mixtures tested were inactive or exhibited a very low activity which was statistically not significantly different to the negative control ($p < 0.05$). In the same vein, 11- and 14-res peptaibols were ineffective or exhibited a very low activity on both phytopathogens even at 50 $\mu\text{g/mL}$. Noticeable antifungal activities ($> 30\%$) was only observed with long peptaibols (18- and 20-res) with differences on the two phytopathogens. On *A. brassicicola*, a significant inhibition appeared for both peptaibol mixtures from 12.5 $\mu\text{g/mL}$ whereas at this concentration no significant inhibition was observed on *B. cinerea*. At 25 $\mu\text{g/mL}$, 18-res were significantly more active than 20-res on *A. Brassicicola*. On the contrary, 20-res were more active than 18-res on *B. cinerea*. In both cases, maximal inhibition was higher than 75 % and was reached at 25 $\mu\text{g/mL}$ followed by a plateau phase for higher concentration (50 $\mu\text{g/mL}$).

A second criterion used to evaluate antifungal activity was a kinetic study of the fungal phytopathogen growth in the presence of peptaibols. For that purpose, fungal growths were monitored by laser nephelometry each hour during the 33 h of culture. Figure 2 shows observed growth in the presence of 14-, 18- and 20-res peptaibols at the concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ (concentration corresponding to the beginning of the plateau phase). As 11-res were previously found to be inactive, they were not compared to others.

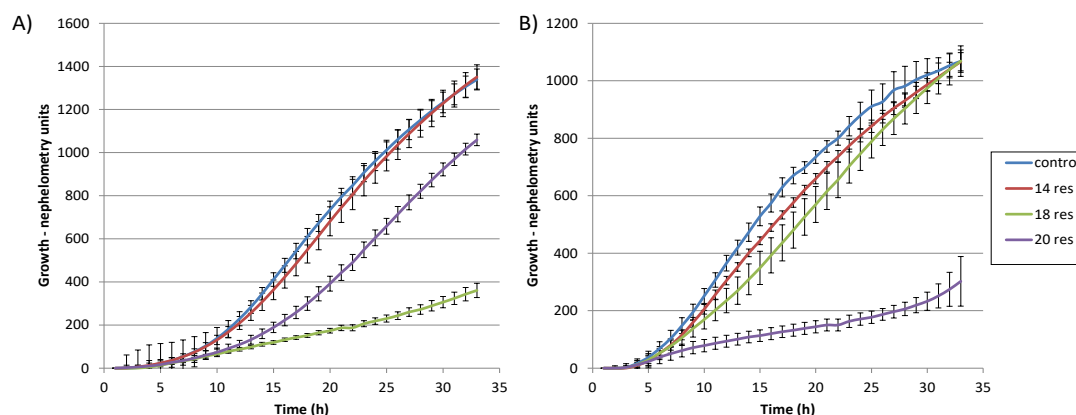


Figure 2. Fungal growth in the presence of peptaibols (14-, 18- and 20-res) at 25 $\mu\text{g/mL}$.

A) Growth of *A. brassicicola*. B) Growth of *B. cinerea*. Data are shown as mean $\pm$ SD(?) (n=3)

The fungal kinetics were compared using t -test ($p < 0.05$). It confirmed the very effective but low activity of 14-res on *Botrytis* and their lack of activity on *Alternaria*. The differences of activity between 18- and 20-res on the two pathogens appeared significantly after 18 h of incubation on *A. brassicicola* and more rapidly, at 10 h, on *B. cinerea*.

Fungal confrontation

As long peptaibols (≥ 17 -res) appeared to be the most effective ones on the tested phytopathogens, it is interesting to compare activity of a strain producing only this kind of peptaibols versus a commercial strain (*T. harzianum* T22), producing both 11 and 18-res peptaibols, considered as a reference. Antifungal activity would be evaluated by a confrontation test with a phytopathogen on a Petri dish.

For that purpose, the marine-derived strain *T. atroviride* MMS927 was selected as it was described to produce only long peptaibols (≥ 17 -res) and notably 19-res closely related to trichorzianines (Carroux et al, 2013). In addition, *T. atroviride* MMS927 exhibited growth rate similar to the commercial strain *T. harzianum* T.22 (78 mm at 6 days) when cultured on PDA dishes at 24°C (Data not shown).

The first step was to verify the antifungal activity of 19-res peptaibols against *A. brassicicola*. The nineteen residue peptaibols were purified from *T. atroviride* MMS927 (supplementary data – Fig. S2) and tested at 50 µg/mL, as previously described for the others peptaibols. After 33 h of incubation, the growth inhibition of *A. brassicicola* reached 87.8 ± 0.25 % confirming the antifungal activity of these long peptaibols.

The comparison of the antagonistic action of both selected *Trichoderma* strains against *A. brassicicola* and *B. cinerea* was performed by direct observation of co-cultures. Figure 3 shows the results obtained on *A. brassicicola*.

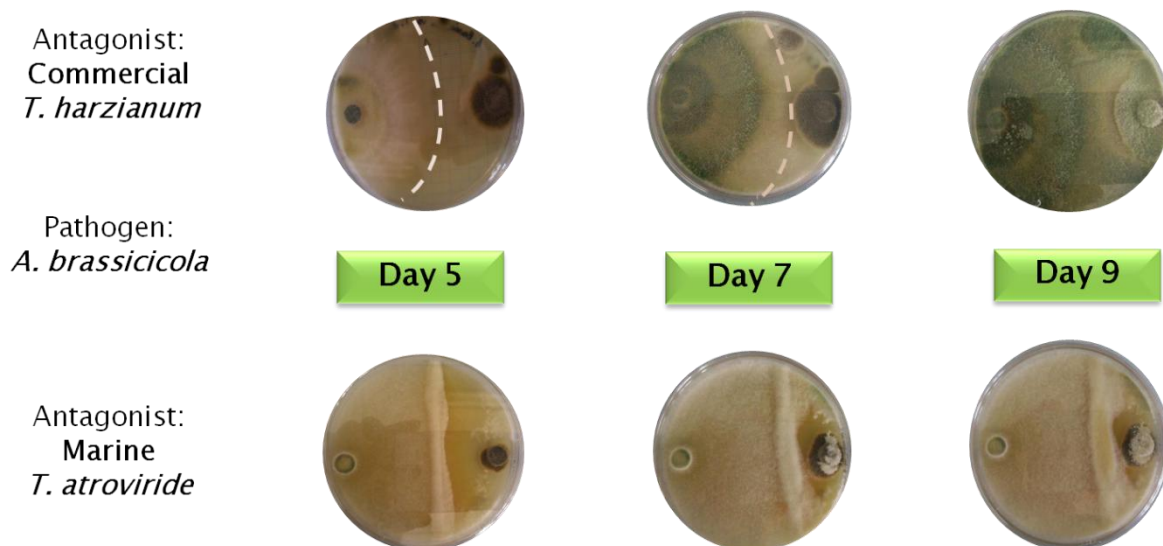


Fig.3. Confrontation between *A. brassicicola* and two peptaibol producing *Trichoderma* strains.

a) Commercial strain *T. harzianum* T22. b) Marine *T. atroviride* MMS 927

Both *Trichoderma* strains grew rapidly and the first apparent physical contact between *Trichoderma* mycelia and *A. brassicicola* occurred within 6 days after inoculation. The marine-derived strain (MMS927) forms a frontline on contact with the pathogen probably due to the antibiosis. This phenomenon was observed only for the marine-derived strain as the commercial *Trichoderma* strain attacked the phytopathogen by parasitism. The percent of inhibition for both phytopathogens *A. brassicicola* and *B. cinerea* were calculated from the observed growth diameters of the different fungi as summarized in Table 1.

Table 1. Inhibition of pathogen growth

Strain	growth inhibition (%)	
	<i>A. brassicicola</i>	<i>B. cinerea</i>
<i>Trichoderma harzianum</i> T 22	71 ± 13	62 ± 21
<i>T. atroviride</i> MMS927	71 ± 19	64 ± 3

Both *Trichoderma* strains exhibited similar antagonistic activity against the tested phytopathogens. No significant statistical difference (t-test, $p < 0.05$) in growth inhibition with the *Trichoderma* strains could be noticed (data not shown).

In-plant activity of 19-res peptaibols

To confirm *in-planta* the activity observed in Petri dishes, cabbage plants were inoculated with *A. brassicicola*. Characteristic necrotic symptoms of the *brassicacea* black spot disease (yellowing of the leaves and reduction of their firmness) appeared on untreated leaves (Figure 4A). For the leaves inoculated and treated with 19-res peptaibols, symptoms were present but with a smaller size depending on the spots (Figure 4B). The size of necroses exceeded 10 mm on untreated leaves whereas it was less than or equal to 10 mm on treated ones. The yellowing was less pronounced and the leaves were stiffer than the untreated ones.

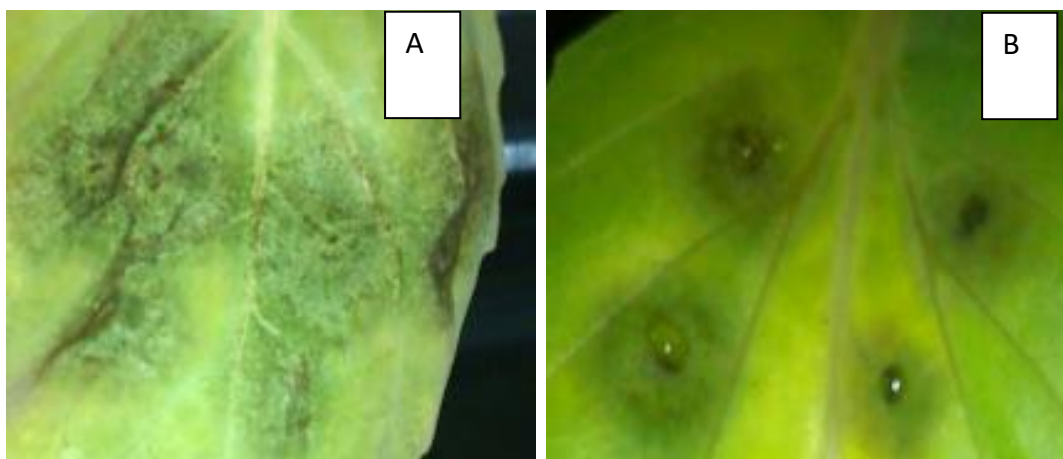


Fig. 4. Assay of 19-res peptaibols on cabbage leaf inoculated with *A. brassicicola*.

A) Untreated inoculated leaf. B) Inoculated leaf treated by 19-res peptaibols.

Discussion

The need to find new treatments against phytopathogens to replace synthetic pesticides is an agronomic priority. There are numerous pathogenic fungi, but among them *A. brassicicola* and *B. cinerea* are particularly widespread. *A. brassicicola* causes the black spot disease (or dark leaf spot) of various Brassicaceae which is one of the most important economically diseases of cultivated *Brassica* (Cooke *et al.*, 1997; Sigareva and Earle, 1999; Cramer and Lawrence, 2004; Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2004). *B. cinerea* is an ubiquitous pathogen causing grey mould disease. It is a necrotrophic fungus for more than 200 crops worldwide, mainly fruits, vegetable and ornamental plants (Elad *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2009). The fungicides like benzimidazole, dicarboximide, carbamate, triazole, fludioxonil or azoxystrobin are commonly applied to antagonise such pathogenic fungi but they could induce a resistance (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2009).

Fungi of the genus *Trichoderma* seem to be an excellent alternative to pesticides and several strains are already commercialized as BCAs. For these fungi, it has been presumed that peptaibols may contribute to their bioactivity (Degenkolb *et al.*, 2008) and all commercial *Trichoderma* sold as BCA have been shown to produce peptaibols (Degenkolb *et al.*, 2015). The present study confirmed this hypothesis with the observation of *in-vitro* and *in-planta* antifungal activities of peptaibols, particularly long-chained ones.

Different studies have highlighted the broad range of biological activities for peptaibols, arising from their membrane-modifying and pore-forming properties (Béven and Wróblewski, 1997; Duclohier and Wroblewski, 2001), generally depending on the length and hydrophobicity of the peptidic chain and the amino acid composition (Le Doan *et al.*, 1986; El Hajji *et al.*, 1989; Rebuffat *et al.*, 1992; Béven *et al.*, 1998; Béven *et al.*, 1999; Grigoriev *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2007). This was observed in the present study with a noticeable difference of activity between short (11- and 14-res) and long (18-, 19- and 20-res) peptaibols. Eleven residue peptaibols constitute the most commonly observed family of peptaibols produced by *Trichoderma* spp.. They have been shown to exhibit several biological activities such as antibacterial one against gram+ bacteria and mycoplasma (Rebuffat *et al.*, 2000), cytotoxicity against KB cells (Ruiz *et al.*, 2007) or mitochondriotoxicity toward porcine sperm cells (Mikkola *et al.*, 2012). Despite these biological activities, the present findings seem to indicate that 11-res peptaibols (and equally 14-res peptaibols) must play a minor role in antifungal activity of *Trichoderma* strains for biological control. Their pore-forming ability must be reduced in fungal membranes.

On the contrary, 18-, 19- and 20-res peptaibols exhibited antifungal activities on the two pathogens *in-vitro*, and, for 19-res, *in-planta*. These results confirmed that longest peptaibols have to be taken into consideration as active secondary metabolites of *Trichoderma* strains against fungal phytopathogens. However, no general relationship between their length and their activity could be deduced from these observations. Eighteen residue peptaibols were the most active ones on *Alternaria* whereas it was the 20-res on *Botrytis*. As peptaibols are known to interact with plasmatic membranes by the formation of pores [4, 13]. Peptaibols have been described to act synergistically with cell-wall-degrading enzymes suggesting their contribution in the antagonistic phenomena of *Trichoderma* spp. against plant pathogens (Schirmbock *et al.*, 1994).

Currently investigations for new BCAs from the marine environment are almost inexistent though marine microorganisms could represent a significant source of new BCAs (Gal-Hemed *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol*, 2011, 77, 5100). In this context, a marine-derived *Trichoderma* strain, selected for its ability to produce long peptaibols and its growth rate, exhibited similar efficiency against phytopathogenic fungi than a commercial *Trichoderma* strain used as BCA. This indicates the potential interest of marine-derived *Trichoderma* strains as new BCAs. The difference of activity observed for peptaibols on the two studied models indicates that phytopathogenic fungi are not equally sensitive to the different series of peptaibols. This implies that for an improved used of *Trichoderma* strains as BCAs, a panel of strains producing different series of peptaibols should be proposed and used. In order to establish the relation “which peptaibols/*Trichoderma*” for “which pathogen”, a large number of growth inhibition tests of the different series of peptaibols against a large selection of economically important plant pathogens such as *Fusarium* spp., *Bipolaris* spp., *Phythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp. or *Sclerotinia* spp. has to be performed. Best *Trichoderma* strains would be then deduced using their peptaibol production profile and their ability to grow quickly in environmental conditions.

Acknowledgements

We are grateful to the platform Corsaire-ThalassOMICS of Biogenouest for the technical support and to the program NABUCO of the Ecophyto plan of the French Ministry for Agriculture and Food for funding these researches and the French Ministry for Education and Research for a PhD grant.

References

- [1] Benitez T, Rincon AM, Limon MC, Codon AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *int microbiol* 2004;7:249-60.
- [2] Béven L, Duval D, Rebuffat S, Riddell FG, Bodo B, Wróblewski H. Membrane permeabilisation and antimycoplasmic activity of the 18-residue peptaibols, trichorzins PA. *Biochim Biophys Acta* 1998;1372:78-90.
- [3] Béven L, Helluin O, Molle G, Duclohier H, Wróblewski H. Correlation between anti-bacterial activity and pore sizes of two classes of voltage-dependent channel-forming peptides. *Biochim Biophys Acta* 1999;1421:53-63.
- [4] Béven L, Wróblewski H. Effect of natural amphiphatic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes. *Res Microbiol* 1997;148:163-75.
- [5] Brückner H, Przybylski M. 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 A* 1984;296:263-75.

- [6] Carroux A, Van Bohemen A-I, Roullier C, Robiou du Pont T, Vansteelandt M, Bondon A, et al. Unprecedented 17-residue peptaibiotics produced by marine-derived *Trichoderma atroviride*. *Chem Biodivers* 2013;10:772-86.
- [7] Cooke DEL, Jenkins PD, Lewis DM. Production of phytotoxic spore germination liquids by *Alternaria brassicae* and *A. brassicicola* and their effect on species of the family *Brassicaceae*. *Ann Appl Biol* 1997;131:413-26.
- [8] Cramer RA, Lawrence CB. Identification of *Alternaria brassicicola* genes expressed *in planta* during pathogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Genet Biol* 2004;41:115-28.
- [9] Degenkolb T, Fog Nielsen KF, Dieckmann R, Branco-Rocha F, Chaverri P, Samuels GJ, et al. Peptaibol, secondary-metabolite, and hydrophobin pattern of commercial biocontrol agents formulated with species of the *Trichoderma harzianum* complex. *Chem Biodivers* 2015;12:662-84.
- [10] Degenkolb T, Gams W, Brückner H. Natural cyclopeptaibiotics and related cyclic tetrapeptides: structural diversity and future prospects. *Chem Biodivers* 2008;5:693-706.
- [11] Degenkolb T, Karimi Aghcheh R, Dieckmann R, Neuhof T, Baker SE, Druzhinina IS, et al. The production of multiple small peptaibol families by single 14-module peptide synthetases in *Trichoderma/Hypocrea*. *Chem Biodivers* 2012;9:499-535.
- [12] Degenkolb T, von Döhren H, Nielsen KF, Samuels GJ, Brückner H. Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chem Biodivers* 2008;5:671-80.
- [13] Duclohier H, Wroblewski H. Voltage-dependent pore formation and antimicrobial activity by alamethicin and analogues. *J Membr Biol* 2001;184:1-12.
- [14] El Hajji M, Rebuffat S, Le Doan T, Klein G, Satre M, Bodo B. Interaction of trichorzianines A and B with model membranes and with the amoeba *Dictyostelium*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1989;978:97-104.
- [15] Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N. *Botrytis spp.* and diseases they cause in agricultural systems - an Introduction. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*: Springer Netherlands; 2007, p. 1-8.
- [16] Grigoriev PA, Schlegel B, Kronen M, Berg A, Hartl A, Grafe U. Differences in membrane pore formation by peptaibols. *J Pept Sci* 2003;9:763-8.
- [17] Iacomì-Vasilescu B, Avenot H, Bataillé-Simoneau N, Laurent E, Guénard M, Simoneau P. *In vitro* fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Protection* 2004;23:481-8.
- [18] Iida A, Sanekata M, Fujita T, Tanaka H, Enoki A, Fuse G, et al. Fungal metabolites. XVI. Structures of new peptaibols, trichokindins I-VII, from the fungus *Trichoderma harzianum*. *Chem Pharm Bull* 1994;42:1070-5.

- [19] Jiang J, Ding L, Michailides TJ, Li H, Ma Z. Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. Pestic Biochem Physiol 2009;93:72-6.
- [20] Joubert A, Calmes B, Berruyer R, Pihet M, Bouchara J-P, Simoneau P, et al. Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. BioTechniques 2010;48:399-404.
- [21] Krause C, Kirschbaum J, Brückner H. Peptaibiotics: microheterogeneity, dynamics, and sequences of Trichobrachins, peptaibiotics from *Trichoderma parceramosum* Bissett (*T. longibrachiatum* Rifai). Chem Biodivers 2007;4:1083-102.
- [22] Le Doan T, El Hajji M, Rebuffat S, Rajesvari MR, Bodo B. Fluorescence studies of the interaction of trichorzianine A IIIc with model membranes. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes 1986;858:1-5.
- [23] Lorito M, Woo SL, Harman GE, Monte E. Translational Research on *Trichoderma*: From 'Omics to the Field. Annu Rev Phytopathol 2010;48:395-417.
- [24] Maddau L, Cabras A, Franceschini A, Linaldeddu B T, Crobu S, Roggio T, et al. Occurrence and characterization of peptaibols from *Trichoderma citrinoviride*, an endophytic fungus of cork oak, using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Microbiology 2009;155:3371-81.
- [25] Martenies SE, Perry MJ. Environmental and occupational pesticide exposure and human sperm parameters: A systematic review. Toxicology 2013;307:66-73.
- [26] Mikkola R, Andersson MA, Kredics L, Grigoriev PA, Sundell N, Salkinoja-Salonen MS. 20-residue and 11-residue peptaibols from the fungus *Trichoderma longibrachiatum* are synergistic in forming Na⁺/K⁺-permeable channels and adverse action towards mammalian cells. FEBS Journal 2012;279:4172-90.
- [27] Mukherjee PK, Horwitz BA, Kenerley CM. Secondary metabolism in *Trichoderma* - a genomic perspective. Microbiology 2012;158:35-45.
- [28] Neumann NK, Stoppacher N, Zeilinger S, Degenkolb T, Brückner H, Schuhmacher R. The peptaibiotics database - a comprehensive online resource. Chem Biodivers 2015;12:743-51.
- [29] Rebuffat S, Duclohier H, Auvin-Guette C, Molle G, Spach G, Bodo B. Membrane-modifying properties of the pore-forming peptaibols saturnisporin SA IV and harzianin HA V. FEMS Microbiol Lett 1992;105:151-60.
- [30] Rebuffat S, Goulard C, Hlimi S, Bodo B. 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 2000;6:519-33.
- [31] Reiber K, Neuhoof T, Ozegowski JH, von Döhren H, Schwecke T. A nonribosomal peptide synthetase involved in the biosynthesis of Ampullosporins in *Sepedonium ampullosporum*. J Pept Sci 2003;9:701-13.

- [32] Ruiz N, Wielgosz-Collin G, Poirier L, Grovel O, Petit KE, Mohamed-Benkada M, et al. New trichobrachins, 11-residue peptaibols from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*. *Peptides* 2007;28:1351-8.
- [33] Schirmbock M, Lorito M, Wang YL, Hayes CK, Arisan-Atac I, Scala F, et al. 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* 1994;60:4364-70.
- [34] Shi M, Chen L, Wang XW, Zhang T, Zhao PB, Song XY, et al. Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. *Microbiology* 2012;158:166-75.
- [35] Sigareva MA, Earle ED. Camalexin induction in intertribal somatic hybrids between *Camelina sativa* and rapid-cycling *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 1999;98:164-70.
- [36] Stoppacher N, Neumann NK, Burgstaller L, Zeilinger S, Degenkolb T, Brückner H, et al. The Comprehensive Peptaibiotics Database. *Chem Biodivers* 2013;10:734-43.
- [37] Viterbo A, Wiest A, Brotman Y, Chet I, Kenerley C. The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Mol Plant Pathol* 2007;8:737-46.
- [38] Vos CMF, De Cremer K, Cammue BPA, De Coninck B. The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Mol Plant Pathol* 2014;1-13.
- [39] Wiest A, Grzegorski D, Xu BW, Goulard C, Rebuffat S, Ebbole DJ, et al. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J Biol Chem* 2002;277:20862-8.
- [40] Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JAL. *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol* 2007;8:561-80.

3.2. Principales conclusions sur l'activité des peptaïbols *in vitro*

Une forte activité des peptaïbols à longue chaîne (> à 17 résidus) a pu être mise en évidence par des mesures de néphélométrie laser alors que ceux à courte chaîne (< à 15 résidus) se sont révélés inactifs ou très faiblement antifongiques. Ces résultats sont cohérents avec les actions antifongiques décrites dans la littérature (Sansom, 1991; Sansom, 1993). Il semble néanmoins que chaque phytopathogène ne réagisse pas de la même manière à l'action des peptaïbols longs. En effet, à 50 µg/mL une activité croissante en relation directe avec la longueur des peptaïbols a été observée sur *B. cinerea*, avec une inhibition de croissance maximale (90%) pour les peptaïbols à 20 résidus alors que sur *A. brassicicola*, les peptaïbols à 18 et 20 résidus semblent avoir des efficacités statistiquement comparables (ANOVA) avec une inhibition maximale observée de 60%. Ceci semble impliquer que lors de la sélection d'une souche de *Trichoderma* pour une utilisation en biocontrôle, il sera nécessaire de tenir compte non seulement de sa production de peptaïbols à longues chaînes mais aussi du pathogène visé. Dans ce contexte, une étude des différentes séries de peptaïbols devra être réalisée sur un plus grand nombre de phytopathogènes pour établir une table d'efficacité de ces différents peptaïbols sur chaque espèce de pathogène.

3.3. Principales conclusions de la comparaison des activités d'une souche marine et d'une souche commerciale de *Trichoderma* en co-cultures avec des phytopathogènes

La souche marine utilisée pour cette étude comparative a été choisie selon deux critères :

- son aptitude à produire des peptaïbols à chaîne longue sans produire de peptaïbols courts (11- et 14-résidus), l'étude précédente ayant en effet montré la différence d'activité entre ces deux groupes,
- son aptitude à se développer rapidement dans les conditions expérimentales : ce paramètre est en effet reconnu comme important pour une application industrielle des souches en biocontrôle car un développement rapide du champignon antagoniste est une qualité essentielle pour assurer un effet maximal.

A titre de témoin de niveau d'activité à atteindre pour une utilisation en biocontrôle, une souche d'origine terrestre, déjà proposée dans une formulation commercialisée, a été étudiée en parallèle.

Parmi les souches de la mycothèque produisant majoritairement des peptaïbols longs, une s'est révélée intéressante (*T. atroviride* MMS 927) car elle remplissait les deux critères : production de peptaïbols à 19 résidus et vitesse de croissance à six jours équivalente à celle de la souche commerciale (Tableau 4-2).

Tableau 4-2 : Croissance des souches de *Trichoderma*

souche	observation à 3 j : diamètre de la colonie (mm)	Observation à 6 j
T22	55,7 ± 2,1	envahissement de la boîte
MMS 927	36,3 ± 0,6	envahissement de la boîte

Comme le montre le tableau précédent, la souche commerciale de *Trichoderma* avaient une croissance plus rapide que la souche marine pendant les trois premiers jours, conduisant à des surfaces couvertes plus importantes. Mais ce phénomène s'inversait ensuite pour arriver à une équivalence totale de surface recouverte au bout de 6 jours. Ce retard de la souche marine peut peut-être s'expliquer par le milieu de culture préparé avec de l'eau distillée, condition de culture moins appropriée à cette souche qu'à la souche de *Trichoderma* commerciale qui est d'origine terrestre.

Dans un second temps, des cultures en confrontation des souches de *Trichoderma* sélectionnées avec les pathogènes ciblés (*A. brassicicola* et *B. cinerea*) ont été effectuées. Les inhibitions pour les phytopathogènes en présence des *Trichoderma* ont été déterminées. Les résultats obtenus ont été similaires pour la souche commerciale et la souche marine de *Trichoderma* indiquant, d'une part que cette souche pourrait donc être un candidat pour être agent de lutte biologique contre ces deux pathogènes et surtout que les deux critères choisis pour la sélection des souches semblent être bons. Ce résultat est très encourageant et l'étude devra être poursuivie pour élargir le champ potentiel de nouveaux agents de biocontrôle en

criblant tous les *Trichoderma* de la mycothèque du laboratoire sur les deux critères utilisés (vitesse de croissance et production de peptaïbols longs en quantité).

3.4. Principales conclusions de l'étude *in planta*

Les choux de la variété Bartolo inoculés avec des suspensions de conidies d'*Alternaria brassicicola* ont été étudiés et les symptômes observés et quantifiés. Les résultats de cette étude ont été malheureusement peu reproductibles. En effet, peu de feuilles ont présenté des nécroses nettes même celles des témoins positifs. Néanmoins, pour les feuilles à partir desquelles les résultats sont interprétables, les plantes inoculées avec *A. brassicicola* en condition témoin positif ont bien présenté des symptômes nécrotiques caractéristiques de la maladie des taches noires des Brassicacées. Pour les plantes inoculées et traitées avec les peptaïbols à 19 résidus, les symptômes ont été présents, mais l'atteinte semblait moins virulente indiquant l'intérêt de ces composés. Le jaunissement a été plus léger et la rigidité de ces feuilles est moins altérée que celle des feuilles témoins positif et la taille des nécroses réduite. Toutefois, ces résultats restent à confirmer par d'autres travaux.

3.5. Activité des nouvelles séries de peptaïbiotiques (15- et 17-résidus) isolées des souches marines – comparaison avec les séries classiques

Cette partie n'est pas abordée dans l'article.

Dans le chapitre 3 de ce manuscrit, 2 nouvelles classes de peptaïbiotiques ont été découvertes. Les séquences de la série à 15 résidus sont des peptaïbols ayant l'originalité de ne pas renfermer de proline dans leur séquence. Dans l'attente de l'identification complète de leur résidu C-terminal, nous considérerons les 17-résidus isolés comme des peptaïbiotiques et non des peptaïbols. Leur activité antifongique a néanmoins été évaluée suivant le protocole décrit précédemment. Les résultats sont regroupés dans la Figure 4-4.

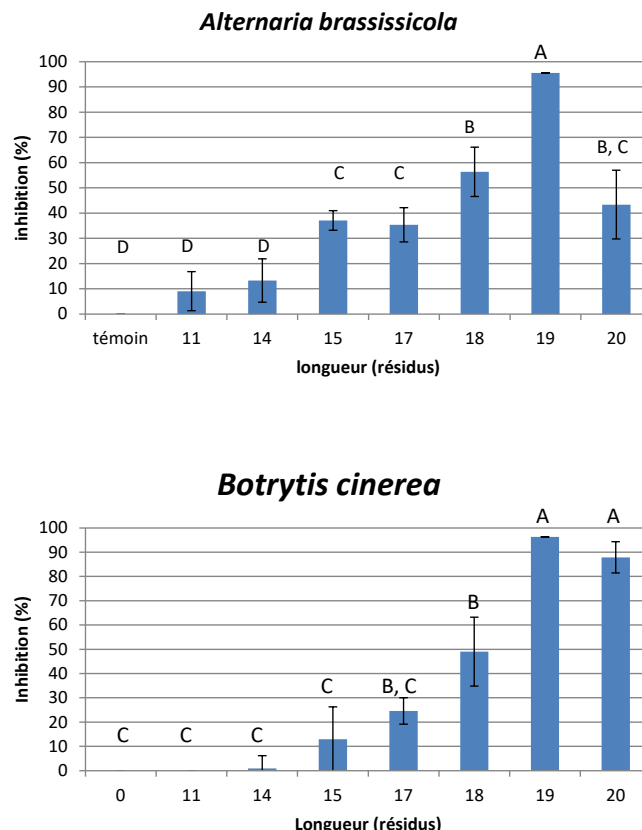


Figure 4-4 : Pourcentage d'inhibition de croissance observé pour les pathogène *A. brassicicola* et *B. cinerea* en présence des différentes longueurs de peptaïbiotiques testés à 50 µg/mL. Barres d'erreur = écart type. Comparaisons statistiques par ANOVA

Comme le montre la figure ci-dessus, sur les deux phytopathogènes il apparaît globalement une relation entre l'activité antifongique et la longueur de la chaîne comme nous l'avons déjà signalé. Pour ce qui est du cas des 15- et 17-résidus on constate une différence suivant le pathogène. Sur *A. brassicicola*, ces deux groupes ont montré une réelle activité similaire pour les deux. Par contre sur *B. cinerea*, si leurs activités observées sont là encore statistiquement similaires (ANOVA), elles restent comparables à celles des peptides à 11 et 14 résidus qui sont considérés comme inactifs.

Dans tous les cas, l'activité antifongique des peptaïbiotiques à 14, 15 et 17 résidus est inférieure à celle observée pour les peptaïbols à 18, 19 et 20 résidus à la concentration 50 µg/mL, confirmant ainsi que les peptaïbols les plus antifongiques ont une longueur de chaîne supérieure à 17 résidus. Ces résultats sont en accord avec les études de conductance

membranaires réalisées sur des pores formés par des peptaïbols de différentes longueurs par Grigoriev et al (Grigoriev *et al.*, 2003). La conformation spatiale de la molécule de peptaïbols est pilotée essentiellement par la présence de résidus Proline (acide aminé cyclique) qui provoquent une courbure de l'hélice (Figure 4-5, A et B). L'association de plusieurs molécules de peptaïbols (en général 8) permet de former des pores à travers les membranes plasmiques (Figure 4-5, C) (Galbraith *et al.*, 2003). Ces pores sont stabilisés par la présence de molécule de glutamine dont les chaînes latérales en s'associant créent des liaisons stables. Afin de faciliter la compréhension du rapport structure-activité en incorporant ces données pour les familles de peptaïbols testés, nous avons représenté schématiquement leurs structures dans la Figure 4-5, A et avons analysé certains caractères chiffrables dans le Tableau 4-3.

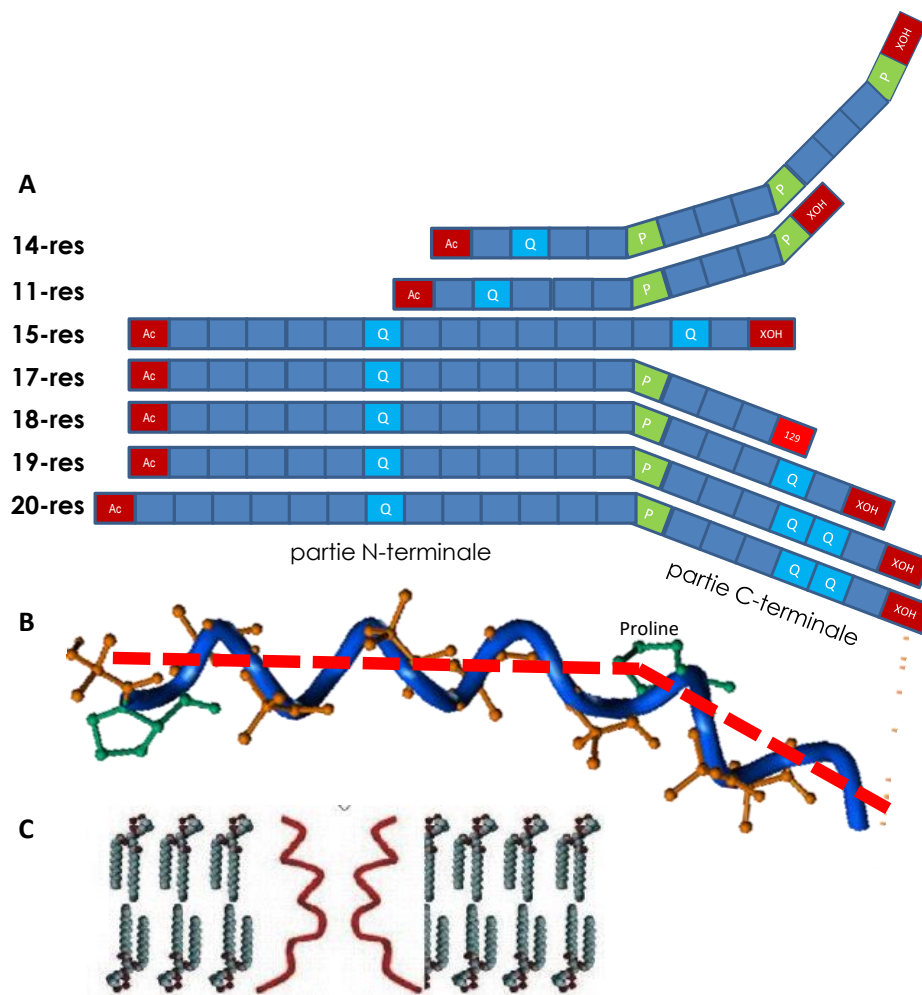


Figure 4-5 : A) Représentation schématique des différentes familles testées de peptaïbols. La présence d'une Proline(P) induit un coude dans la structure. Les résidus glutamine (Q) qui jouent un rôle dans la stabilisation des structures formées au niveau transmembranaire sont indiqués. B) structure de l'alaméthicine, peptaïbol à 20 résidus montrant la courbure de l'hélice produite par la proline (d'après <http://peptaibol.cryst.bbk.ac.uk/alamethicin1.htm>). C) Formation des pores dans la bicouche lipidique par association de molécules de peptaïbols (d'après (Galbraith *et al.*, 2003))

Tableau 4-3 : Comparaison de différents critères chiffrables sur les séquences des peptaïbols testés par rapport aux inhibitions provoquées sur les deux phytopathogènes

	longueur totale	longueur avant premier P	longueur après dernier P	position premier Q	nb total Q	nb tot P	Inhibition à 50µg/mL sur <i>A. bras.</i>	Inhibition à 50µg/mL sur <i>B. cin.</i>
	11	5	1	2	1	2	9	0
	14	4	1	2	1	3	13	1
	15			6	2	0	37	12
	17	12	4	6	1	1	35	23
	18	12	6	6	2	1	56	45
	19	12	7	6	3	1	96	89
	20	13	7	7	3	1	43	71
correlation activité <i>A. brassicicola</i>	0,755	0,721	0,847	0,669	0,782	-0,508		
correlation activité <i>B. cinerea</i>	0,878	0,805	0,950	0,704	0,901	-0,394		

Le tableau 4-3 fait clairement apparaître la proximité de structure des peptaïbols les plus longs (17-, 18-, 19- et 20-résidus) pour lesquels deux parties distinctes apparaissent : une extrémité N-terminale acétylée (avant la proline) et une extrémité C-terminale dont le dernier acide aminé est transformé en amino-alcool (le cas des 17-résidus étant à part). Cette structure en deux parties n'apparaît pas chez les 15-résidus du fait de l'absence de proline. (Wada *et al.*, 1997) et (Duclohier, 2004) ont montré l'importance de la glutamine et de la proline pour obtenir une efficacité maximale et une stabilité des pores formés par les peptaïbols dans les membranes plasmiques. Ils ont aussi discuté de l'importance de leur positionnement dans la chaîne peptidique. Nous avons voulu vérifier si ces remarques pouvaient être reportées sur l'activité antifongique vis-à-vis des phytopathogènes étudiés. Pour cela nous avons relevé un certain nombre de critères sur les groupes de peptaïbols testés :

- leur longueur totale en nombre de résidus (hors groupement acétyle N-terminal)
- la longueur de la partie N-terminale (avant la proline)
- la longueur de la partie C-terminale (après la proline)
- la position de la glutamine dans la partie N-terminale
- le nombre total de glutamines (ou acide aminé équivalent)

- le nombre total de prolines

Nous avons corrélé ces critères avec les activités observées sur les deux pathogènes. Le caractère qui est apparu le plus important pour l'activité n'a pas été la longueur totale de la chaîne peptidique comme on aurait pu le penser, mais la longueur de la partie C-terminale ($r = 0,847$ et $0,950$ sur *A. brassicicola* et *B. cinerea* respectivement). Il semblerait donc que cette partie de la molécule joue un rôle primordial dans l'activité. Néanmoins la longueur totale reste un critère important et fortement corrélé à l'activité et il semblerait que la longueur optimale pour s'insérer dans les membranes plasmiques des phytopathogènes étudiés soit de 19 résidus. La longueur de la structure obtenue devant alors être proche de l'épaisseur des membranes (Figure 4-5, C). Néanmoins les différences d'activités apparues vis-à-vis des deux phytopathogènes semblent indiquer que d'autres facteurs, propres aux champignons ciblés, doivent intervenir en plus des critères précités pour expliquer l'activité

4. Etude des interactions chimiques antagonistes *Trichoderma* sp.-phytopathogènes par une approche métabolomique

Cette partie n'est pas abordée dans l'article en préparation.

Si les études précédentes confirment bien l'implication des peptaïbols, et particulièrement de ceux à longues chaînes peptidiques, dans l'utilisation fructueuse du genre *Trichoderma* en tant qu'agent de biocontrôle, d'autres métabolites peuvent prendre part à leurs activités biologiques. Les *Trichoderma* produisent également une large variété de métabolites secondaires incluant d'autres peptides non-ribosomaux, des polyketides, des terpénoïdes et des pyrones (Mukherjee *et al.*, 2012). Ces métabolites peuvent également montrer des activités antimicrobiennes intéressantes pour le contrôle biologique. Des études utilisant des approches métabolomiques ont donc toute leur importance pour une meilleure compréhension du rôle des peptaïbols et d'autres métabolites dans les interactions *Trichoderma*-phytopathogène.

Dans le but de connaître la production de métabolites des *Trichoderma* et du pathogène *B. cinerea* ainsi que d'étudier l'induction de nouveaux métabolites lors de la confrontation

Trichoderma-pathogène, une étude métabolomique en confrontation a été entreprise en suivant le protocole décrit par Bertrand *et al.* en 2014 (Bertrand *et al.*, 2014).

L'étude de la production de métabolites par les différentes souches fongiques employées a débuté par une première recherche en 2 parties présentées ici. La première étude consiste à connaître l'induction de métabolites diffusés dans le milieu de culture gélosé lors de la co-culture de la souche de *T. atroviride* face au pathogène *B. cinerea* à 3 jours d'incubation. La seconde consiste à évaluer la production de nouveaux métabolites, au sein du mycélium, par les souches fongiques lors de la co-culture antagoniste-pathogène. La recherche des ions caractéristiques des peptaïbols a également été entreprise dans cette étude afin de voir si ces métabolites secondaires étaient diffusées dans la gélose ou surexprimées dans le mycélium lors des co-cultures. Après trois jours de culture, les données récoltées n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de peptaïbols. Ceci corrobore les résultats qui seront présentés dans le chapitre suivant (Chapitre 5) sur la mise au point d'une méthode de dosage des peptaïbols dans les extraits bruts de *Trichoderma* qui a montré qu'après 3 jours de culture, leur présence était en quantités inférieures à la limite de détection de la méthode d'analyse mise au point. La méthode d'extraction et de détection utilisées pour la présente étude métabolomique n'étant pas optimisée spécifiquement pour les peptaïbols, il ne semble donc pas anormal de ne pas les détecter dans les extraits à 3 jours de culture.

4.1. Métabolites induits diffusés dans la gélose lors des co-cultures

Les données acquises en mode positif ont été retraitées pour comparer les chromatogrammes des différents groupes d'échantillons (gélose de la mono-culture de *Botrytis*, gélose de la mono-culture de *Trichoderma* et gélose de la co-culture) afin de visualiser plus particulièrement les ions présents uniquement dans la gélose de la co-culture. En effet, dans cette étude le but est d'évaluer l'induction de métabolites diffusés dans le milieu de culture lors des co-cultures par rapport aux mono-cultures des champignons. Un graphique en volcan, représentant la significativité des ions en fonction de la variation de leurs aires sous pics (« fold change ») a été réalisé afin de discerner statistiquement les métabolites intéressants (Figure 4-6)

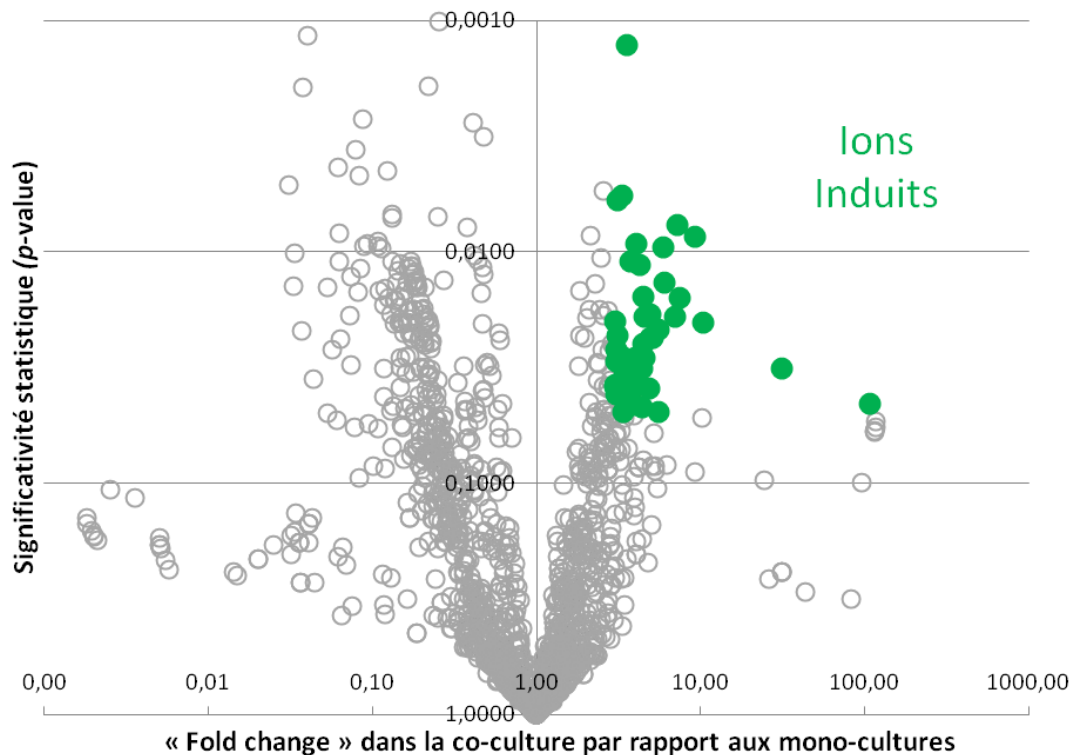


Figure 4-6 : Graphique en volcan obtenu pour les prélèvements de géloses à 3 jours d'incubation. Fold change > 3, p -value $\leq 0,05$. En vert, les métabolites induits et diffusés dans la gélose.

L'analyse des données a permis de mettre en évidence plusieurs ions induits (« fold change » > 3 et p -value $\leq 0,05$) dans les échantillons de gélose en co-culture *Trichoderma/Botrytis* par rapport aux échantillons de gélose de ces-mêmes champignons en mono-culture (Figure 4-6). Ces ions sont clairement reliés à des métabolites qui sont donc plus présents dans les échantillons de gélose en co-culture *Trichoderma/Botrytis* par rapport aux échantillons de gélose des champignons cultivés seuls. Les rapports m/z déterminés pour ces ions et leurs temps de rétention correspondants sont donnés dans le tableau suivant. A partir de cette sélection, une prédiction *in silico* des formules brutes associées à chacun de ces rapports m/z a été entreprise (Tableau 4-4).

Tableau 4-4 : Caractéristiques des métabolites décrits comme induits graphiquement et sécrétés dans la gélose. « Fold change » > 3, *p*-value ≤ 0,05

<i>m/z</i>	RT (min)	« Fold change »	<i>p</i> -value	Formule brute probable	Composé potentiel/Organisme producteur
185,1253	1,82	4,01	0,0288	C ₈ H ₁₁ NO ₄ [M+H] ⁺	Antibiotic MR566B,MR304A ou 1-(1,4,5-trihydroxy-2-isocyano-2-cyclopentenyl)ethanol / <i>Trichoderma harzianum</i>
211,1439	2,56	4,12	0,0092	C ₁₀ H ₁₃ NO ₄ [M+H] ⁺	3-isopropyl-1H-pyrrole2,5-dione;N-2-carboxyethyl/ champignon de mangrove non-identifié
219,1133	2,08	5,55	0,0495	Nombre trop important	
227,1743	6,12	3,10	0,0298	C ₁₅ H ₂₄ [M+H] ⁺	Cyclofarnesa-4,7,9-triene;(6R,7E,9Z)-form/ <i>Botrytis cinerea</i>
233,1941	16,02	3,89	0,0381	n.d.	
245,1277	3,94	3,36	0,0057	C ₁₅ H ₁₆ O ₃ [M+H] ⁺ C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂ [M+H] ⁺	
245,1881	1,88	3,04	0,0378	n.d.	
261,1223	1,45	4,56	0,0190	C ₁₅ H ₁₆ O ₄ [M+H] ⁺	3-hydroxy-4-oxocyclofarnesa-2,5,7,9-tetraen-11,8-olide;(7Z)-form/ <i>Botrytis cinerea</i>
261,1576	6,54	4,43	0,0320	n.d.	
284,1364	4,52	6,02	0,0136	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₂ [M+H] ⁺	
310,3103	22,29	10,40	0,0202	n.d.	
311,2207	24,01	3,13	0,0231	C ₁₈ H ₃₀ O ₄ [M+H] ⁺	
328,1393	1,02	3,05	0,0386	n.d.	
339,1783	13,33	4,03	0,0460	C ₁₈ H ₂₆ O ₆ [M+H] ⁺ C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₃ [M+H] ⁺	
342,2023	3,80	4,20	0,0371	C ₁₉ H ₂₉ NO ₃ [M+Na] ⁺	
353,2292	9,22	3,34	0,0388	C ₂₀ H ₃₂ O ₅ [M+H] ⁺ C ₁₈ H ₃₄ O ₅ [M+Na] ⁺	
365,1943	1,22	5,11	0,0235	C ₁₈ H ₃₀ O ₆ [M+Na] ⁺ C ₁₀ H ₁₄ O ₃ [2M+H] ⁺	Methyl botryolate/ <i>Botrytis cinerea</i> 6-(4-Hydroxypentyl)-2H-pyran-2-one / <i>Trichoderma harzianum</i> et <i>viride</i>
371,1951	1,30	5,97	0,0096	Nombre trop important	
393,2203	1,16	7,45	0,0159	C ₁₁ H ₁₆ O ₃ [2M+H] ⁺	Trichocyalide B, 4-(1-Hydroxy-4-hexenyl)-3-methyl-2(5H)-furanone / <i>Trichoderma sp.</i>
407,2326	1,76	3,21	0,0405	C ₂₀ H ₃₀ N ₄ O ₅ [M+H] ⁺ C ₂₄ H ₃₅ ClO ₃ [M+H] ⁺ C ₂₁ H ₃₆ O ₆ [M+Na] ⁺	
408,3233	25,87	6,98	0,0191	C ₂₈ H ₄₁ NO [M+H] ⁺	
427,2076	1,36	4,53	0,0249	C ₂₅ H ₃₀ O ₆ [M+H] ⁺ C ₂₆ H ₂₆ N ₄ O ₂ [M+H] ⁺ C ₂₀ H ₃₁ N ₂ O ₆ P [M+H] ⁺ C ₂₃ H ₃₂ O ₆ [M+Na] ⁺	
434,1814	6,98	5,56	0,0218	C ₂₃ H ₂₃ N ₅ O ₄ [M+H] ⁺ C ₂₂ H ₂₇ NO ₈ [M+H] ⁺ C ₂₃ H ₂₃ ClNO ₅ [M+H] ⁺	
511,2482	14,63	4,95	0,0186	C ₁₂ H ₂₀ O ₅ [2M+Na] ⁺ C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂ [2M+Na] ⁺ C ₁₂ H ₁₇ NO ₅ [2M+H] ⁺	
531,2669	19,76	4,50	0,0156	C ₂₉ H ₃₈ O ₉ [M+H] ⁺ C ₂₇ H ₄₀ O ₉ [M+Na] ⁺ C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O [2M+Na] ⁺	
553,3870	28,30	4,88	0,0390	C ₄₀ H ₅₀ [M+Na] ⁺ C ₃₃ H ₅₄ O ₅ [M+Na] ⁺	
762,5525	28,62	9,24	0,0086	C ₄₂ H ₇₇ NO ₉ [M+Na] ⁺	
n.d. : non déterminé					

Quelques ions n'ont pas permis la détermination de formules brutes des molécules correspondantes. Certains ions correspondant à des adduits $[2M+Na]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+H]^+$ ou $[M+H]^+$, reliés à des formules brutes ont permis de remonter à des composés décrits dans la littérature comme produits par les champignons ciblés (*Botrytis* et *Trichoderma*) (Tableau 4-4). Lorsque les adduits sont $[2M+Na]^+$ ou $[2M+H]^+$, la recherche des ions $[M+Na]^+$ ou $[M+H]^+$ correspondants a été effectuée afin de confirmer leur présence. La recherche des formules brutes de certains autres ions a donné un nombre très important de réponses probables, ne permettant pas leur détermination. D'autres ions sont reliés à des formules brutes qui n'ont trouvé aucune correspondance avec des métabolites fongiques de *Trichoderma* ou de *Botrytis* dans les bases de données. Il pourrait dans ce cas s'agir de molécules nouvelles qui devront être isolées afin de déterminer leurs structures et d'étudier leurs activités biologiques.

4.2. Métabolites induits dans le mycélium lors des co-cultures

La première étude ayant permis de déterminer un nombre important de composés induits dans le milieu de culture, il a semblé intéressant de savoir si les mêmes métabolites étaient également induits dans le mycélium des champignons lors de la co-culture. Pour cela les extraits du mycélium et du milieu de culture colonisé des co-cultures et des mono-cultures prélevés à 3 jours ont été analysés par HR-MS en mode positif. Comme précédemment (cf. 4.1.), une analyse univariée a été effectuée et les résultats représentés sous forme de graphiques en volcan (« fold change » en fonction de la significativité), afin de discerner les ions présents de manière plus importante dans les extraits de mycélium et le milieu colonisé des co-cultures par rapport aux mono-cultures (Figure 4-7 et Figure 4-8).

4.2.1. Métabolites induits et réprimés chez *Botrytis*

Plusieurs molécules ont pu être mises en évidence de par leur présence significativement plus importante (« fold change » > 3 et $p\text{-value} \leq 0,05$) dans les échantillons de co-culture par rapport aux échantillons des mono-cultures de *Botrytis*. Plusieurs ions (Figure 4-7) semblent être induits ou réprimés chez *Botrytis* lors de sa mise en co-culture face à *T. atroviride*.

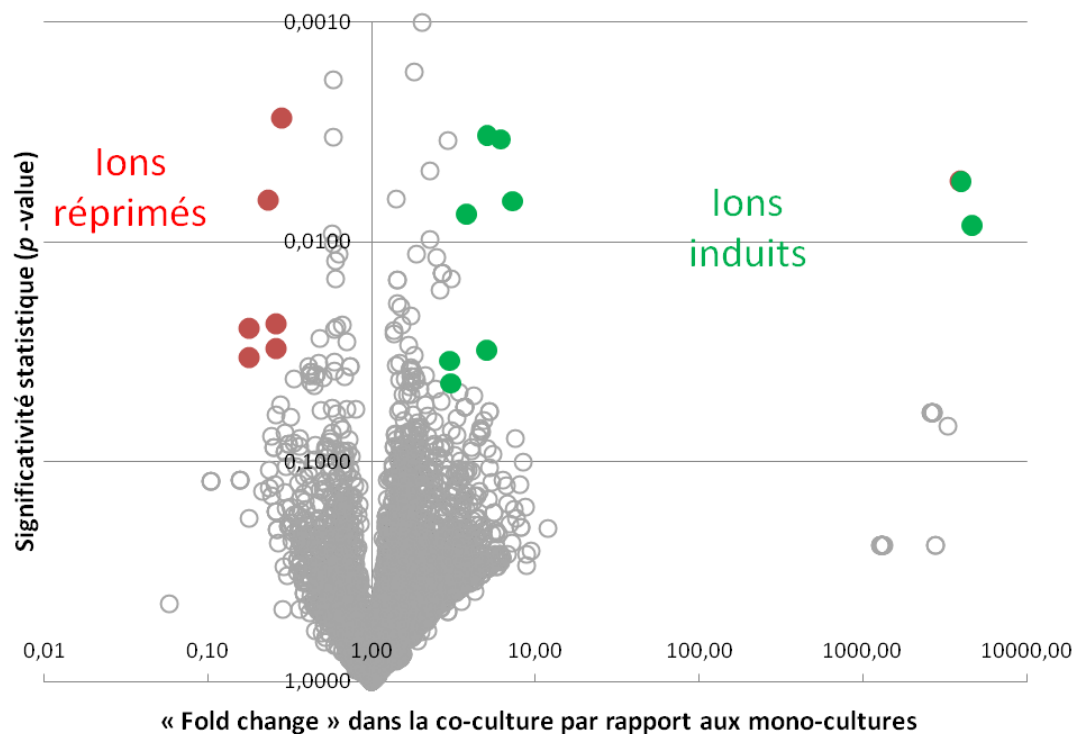


Figure 4-7 : Graphique en volcan obtenu pour les prélèvements de mycélium du champignon *Botrytis cinerea* en co-culture face au *Trichoderma* MMS 927 à 3 jours d'incubation. « Fold change » > 3, p -value < 0,05. En vert, les métabolites induits et en rouge les réprimés.

Les ions induits (en vert) semblent particulièrement intéressants à étudier car ils pourraient correspondre à des métabolites de défenses produits par *Botrytis* en réponse à l'agression du *Trichoderma*. Le parti a donc été pris dans un premier temps de se focaliser sur ces ions. Les valeurs correspondantes de leurs rapports m/z et les temps de rétention associés sont donnés dans le tableau suivant. A partir de cette sélection, une prédiction *in silico* des formules brutes associées à chacun de ces rapports m/z a été entreprise (Tableau 4-5).

Tableau 4-5 : Caractéristiques des métabolites décrits comme induits graphiquement chez *Botrytis*. « Fold change » > 3, p -value ≤ 0,05

m/z	RT (min)	« Fold change »	p -value	Formule brute probable
256,2653	19,51	5,07	0,0310	
280,2615	18,62	5,08	0,0033	
297,2889	19,58	6,13	0,0034	$C_{19}H_{36}O_2 [M+H]^+$
320,2516	16,27	3993,60	0,0053	$C_{20}H_{33}NO_2 [M+H]^+$
327,5019	15,04	3916,80	0,0053	
451,2334	15,91	3,01	0,0348	
480,8079	6,50	4659,20	0,0084	
611,2878	15,73	7,26	0,0065	$C_{33}H_{40}N_4O_6 [M+H]^+$

Tous les ions de ce tableau n'ont pas pu être reliés à des formules brutes de molécule. De plus, lorsqu'une formule brute a pu être identifiée, aucune correspondance n'a été trouvée avec des composés décrits dans les bases de données comme étant des métabolites fongiques de *Botrytis*. Il pourrait s'agir de nouveaux métabolites intéressants à purifier et à étudier du point de vue de leurs activités biologiques.

Dans un second temps, il a semblé intéressant de rechercher les métabolites réprimés dans la co-culture par rapport à la mono-culture de *Botrytis* afin de voir si la production de certains composés a été inhibée lors de la confrontation avec le *Trichoderma*. D'après cette étude, 2 ions correspondent aux critères de sélection (« Fold change » < 1/3 et p -value $\leq 0,05$) et sont élués à un RT considéré comme valide (>1min et <30 min). Les informations concernant les ions d'intérêt sont présentées Tableau 4-6.

**Tableau 4-6 : Caractéristiques des métabolites décrits comme réprimés graphiquement chez *Botrytis*.
« Fold change » < 1/3, p -value $\leq 0,05$**

<i>m/z</i>	RT (min)	« Fold change »	p -value	Formule brute probable
120,0828	1,05	0,18	0,0337	
371,1944	1,35	0,23	0,0065	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃ [2M+Na] ⁺ C ₁₂ H ₁₄ O [2M+Na] ⁺

Tous les ions de ce tableau n'ont pas pu être reliés à des formules brutes de molécules. Seul l'ion (*m/z* 371,1944 RT = 1,35 min) pourrait correspondre à 2 adduits [2M+Na]⁺ dont les formules brutes n'ont pas trouvées de correspondance avec des composés décrits dans les bases de données. Il sera intéressant de les isoler afin de les caractériser. Néanmoins on peut remarquer que ce composé qui diminue dans le mycélium du *Botrytis* en co-culture, se retrouve dans la gélose à l'interface des deux champignons (Tableau 4-4). Il pourrait donc s'agir d'un métabolite excrété par le champignon en cas de présence du *Trichoderma*. Il sera donc intéressant de l'identifier car il pourrait s'agir d'une molécule de défense du *B. cinerea*.

4.2.2. Métabolites induits et réprimés chez *Trichoderma*

Plusieurs molécules ont pu être mises en évidence par leur présence significativement différente dans les échantillons de co-culture par rapport aux échantillons des mono-cultures de *Trichoderma*. Plusieurs ions représentés par des points rouges semblent être induits ou

réprimés chez *Trichoderma* lors de sa mise en culture face au pathogène *Botrytis cinerea* (Figure 4-8).

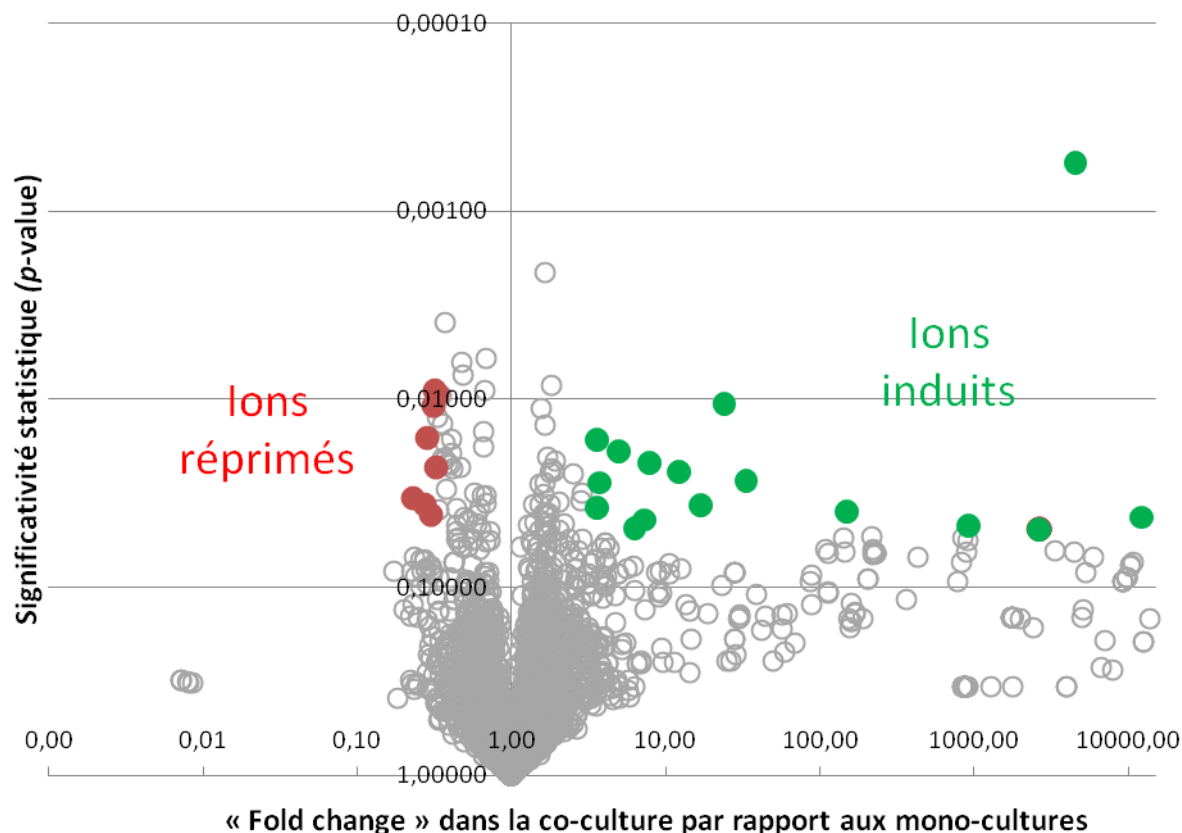


Figure 4-8 : Graphique en volcan obtenu pour les prélèvements de mycélium du champignon *Trichoderma* MMS 927 en co-culture face au *Botrytis cinerea* à 3 jours d'incubation. « Fold change » > 3, p -value < 0,05. En vert, les métabolites induits et en rouge les réprimés.

Le choix a été fait de se focaliser plus particulièrement sur les métabolites induits dans le mycélium de *Trichoderma* car ils pourraient correspondre à des métabolites jouant un rôle dans le comportement antagoniste du *Trichoderma*. D'après cette étude, 21 métabolites semblent induits (« Fold change » > 3 et p -value $\leq$ 0,05). Les informations concernant les ions d'intérêt sont résumées dans le Tableau 4-7.

Tableau 4-7: Caractéristiques des métabolites décrits comme induits graphiquement chez *Trichoderma*. « Fold change » > 3, *p*-value ≤ 0,05

m/z	RT (min)	« Fold change »	<i>p</i> -value	Formule brute probable
144,9829	28,77	6,28	0,0485	
200,2004	14,32	7,85	0,0218	
226,2150	15,20	12219,87	0,0425	
228,2299	17,06	33,25	0,0273	
247,2400	20,16	3,56	0,0380	
254,2471	17,69	919,01	0,0470	
256,2609	19,60	16,93	0,0365	C ₁₆ H ₃₃ NO [M+H] ⁺
265,2562	20,15	23,96	0,0105	C ₁₈ H ₃₂ O [M+H] ⁺
268,2611	19,62	4531,20	0,0005	
277,0456	6,62	4,92	0,0190	C ₁₅ H ₁₀ O ₄ [M+H] ⁺ C ₅ H ₅ NO ₃ [2M+Na] ⁺
280,2636	18,66	148,52	0,0397	C ₁₈ H ₃₃ NO [M+H] ⁺
282,2788	20,17	12,12	0,0244	
284,2929	21,98	3,71	0,0278	
290,2663	11,08	3,60	0,0164	
296,2540	15,16	2653,87	0,0493	
324,1560	15,06	2619,73	0,0493	
432,2410	18,90	2662,40	0,0493	C ₂₄ H ₃₃ NO ₆ [M+H] ⁺ C ₂₂ H ₃₅ NO ₆ [M+Na] ⁺
511,2473	14,54	7,26	0,0439	C ₁₂ H ₂₀ O ₅ [2M+Na] ⁺ C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂ [2M+Na] ⁺ C ₁₂ H ₁₇ NO ₅ [2M+H] ⁺
520,3439	14,38	2636,80	0,0494	C ₃₃ H ₄₅ NO ₃ [M+H] ⁺
563,5448	20,12	2662,40	0,0493	
611,3042	15,83	2662,40	0,0494	

Tous les ions de ce tableau n'ont pas pu être reliés à des formules brutes de composés. De plus, lorsqu'une formule brute a pu être identifiée pour un ion, elle n'a pas permis de trouver une correspondance avec des composés décrits dans la base de données comme étant des métabolites fongiques de *Trichoderma*. Ceci pourrait signifier que trop peu d'études sur le métabolome de *Trichoderma* en co-culture, ou non, ont été menées. Il apparaît alors d'autant plus intéressant de continuer cette étude métabolomique afin d'enrichir les connaissances sur la production de métabolites chez le *Trichoderma*. Cependant, il est remarquable que l'ion *m/z* 511,2473, RT = 14,54 min ait aussi été détecté dans les échantillons de gélose en co-culture. Il pourrait donc s'agir d'un métabolite de *Trichoderma* sécrété dans le milieu de culture. Les formules brutes probables n'ont néanmoins pas permis d'identifier avec certitude ce composé. Il sera alors intéressant de l'isoler pour connaître son rôle dans les interactions *Trichoderma/Botrytis*. De manière plus étonnante, 2 métabolites semblent être induits aussi bien dans le mycélium de *Trichoderma* que dans celui de *Botrytis* lors de leur co-culture. Il s'agit des métabolites ayant les rapports *m/z* 280,2636, RT=18,66 min et *m/z* 256,2609, RT=19,60 min.

Leur formule brute probable a été déterminée comme $C_{18}H_{33}NO$ $[M+H]^+$ et $C_{16}H_{33}NO$ $[M+H]^+$ respectivement. Malheureusement, aucune correspondance avec des composés décrits dans les bases de données n'a pu être établie pour ces 2 métabolites. Là encore il faudra les isoler afin de les caractériser.

5. Conclusion du chapitre

Globalement, cette étude confirme l'intérêt des *Trichoderma* sp. en tant qu'agents de biocontrôle contre les champignons phytopathogènes. Les peptaïbols, déjà connus pour leurs nombreuses activités biologiques, ont démontré un caractère antifongique qui est de premier plan pour expliquer l'activité globale des *Trichoderma* qui les produisent. Néanmoins tous ne sont pas actifs, seuls ceux à longue chaîne présentent un intérêt potentiel, et leur activité est dépendante du phytopathogène ciblé. Leur présence est, avec la vitesse de croissance des souches productrices, un critère à retenir pour la sélection de futurs agents de biocontrôle. Parmi les *Trichoderma* sp. marins, ceux qui produisent des peptaïbols longs et ont une pousse rapide sont donc d'excellents candidats pour un développement futur comme l'a montré l'étude du *T. atroviride* marin MMS 927.

De plus, il ne faut pas négliger la production d'autres métabolites par les *Trichoderma* sélectionnés, et l'approche de métabolomique initiée dans cette étude sera un excellent moyen pour la détection de composés bioactifs produits par les agents de biocontrôle ou par les phytopathogènes à leur contact. Elle devrait également permettre de vérifier l'absence de production de mycotoxines par les souches qui seraient sélectionnées pour une utilisation de terrain.

Chapitre 5 : Analyses qualitative et quantitative des peptaïbols dans les extraits bruts des souches de *Trichoderma*

1. Contexte

Au regard des résultats obtenus dans le chapitre précédent, révélant une activité plus importante des peptaïbols à longue chaîne sur les phytopathogènes, il paraît alors important de sélectionner les souches de *Trichoderma* produisant ces peptaïbols d'intérêt pour une utilisation en biocontrôle. En effet, afin de sélectionner les souches les plus compétitives dans la lutte biologique, il est nécessaire de quantifier leur production de métabolites fongiques d'intérêt.

La mise au point d'une méthode analytique originale permettant la quantification de la production des différents groupes de peptaïbols dans les extraits bruts de *Trichoderma* a alors été réalisée. Peu d'études sur la quantification des peptaïbols par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ont été réalisées. Pour rappel, en 2007, Poirier *et al.* ont mis au point une méthode de dosage pour quantifier la présence de peptaïbols dans des sédiments marins en utilisant l'alaméthicine comme référence (Poirier *et al.*, 2007). En 2012, Mikkola *et al.* ont quantifié la production de peptaïbols dans des extraits bruts de *T. longibrachiatum* par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en utilisant également l'alaméthicine comme référence (Mikkola *et al.*, 2012). Le point commun entre ces études est le standard utilisé, l'alaméthicine étant le seul peptaïbol commercialement disponible (Sigma Aldrich, n°A 4665).

Comme vu dans les parties précédentes, les peptaïbols n'ont pas le même comportement suivant leur longueur : séparation sur colonne de silice, ionisation et activité biologique. Cela a également été évoquée par Poirier en 2007 (Poirier, 2007). Il est alors possible de penser que le dosage des différents groupes de peptaïbols par un standard unique à 20 résidus peut induire un biais sur leur quantification, notamment pour les peptaïbols les plus courts (à 11 résidus).

La première étape nécessaire à la sélection des souches de *Trichoderma*, en vue de leur utilisation comme BCA, est une étude qualitative de leur production de peptaïbols. Une étude des profils de production des peptaïbols en spectrométrie de masse en utilisant différents appareillages semble donc importante pour juger de la stabilité de ces profils et pour présélectionner des souches d'intérêt.

Puis, dans un but de quantification des peptaïbols dans les extraits bruts de *Trichoderma*, le protocole d'extraction a été optimisé, notamment grâce à des essais avec divers solvants et mélanges de solvants. Les choix du mode de détection ainsi que des paramètres instrumentaux ont également été réalisés afin d'atteindre les conditions de quantification des molécules d'intérêt optimales.

L'originalité de cette étude porte sur le dosage de chaque groupe de peptaïbols en fonction de leur nombre de résidus en utilisant un standard adapté, c'est-à-dire ayant le même nombre de résidus et donc des caractéristiques physico-chimiques semblables. Trois étalons externes ont donc été choisis parmi des séquences classiquement produites par les souches de *Trichoderma* et synthétisés par le Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE) de Perpignan. Le peptaïbol à 11 résidus correspond à l'hypomurocine A-III, celui à 14 résidus correspond à la bergofongine D (sans hydroxyproline) et celui à 20 résidus est la séquence F50/5 d'alaméthicine.

La validation et l'utilisation de la méthode de dosage LC-MS afin d'étudier une cinétique de production de peptaïbols par une souche de *Trichoderma* ainsi que de sélectionner différentes souches potentiellement utilisables comme BCA, sont décrites dans un article publié dans Journal of Chromatography B qui constitue une partie de ce chapitre de thèse.

2. Matériel et méthodes liés au chapitre

Les souches choisies ainsi que les paramètres utilisés en spectrométrie de masse sur les différents appareillages sont détaillés dans cette partie.

2.1. Choix des souches

Des fractions purifiées par chromatographie liquide sous vide (VLC) CH₂Cl₂/MeOH (90:10; v/v) de 13 souches de *Trichoderma* ont été qualitativement et quantitativement analysées. Les souches utilisées dans cette étude sont référencées MMS 13, MMS 19, MMS 58, MMS 151, MMS 510, MMS 639, MMS 755, MMS 852, MMS 927, MMS 975, MMS 1255 et MMS 1541 et T 22 au laboratoire. Elles ont été choisies pour l'obtention de classes variées et représentatives des différents peptaïbols produits par les *Trichoderma*. La souche T 22 a quant à elle était

choisie car elle est la base d'une préparation commerciale utilisée en biocontrôle. Connaître sa production de peptaïbols a donc semblé intéressant afin de la comparer aux souches marines et d'établir un lien entre production de peptaïbols et activité antagoniste des souches de *Trichoderma*.

Pour l'optimisation de l'extraction des peptaïbols à partir de la biomasse fongique dans le but de réaliser une analyse quantitative de la production en peptaïbols des *Trichoderma*, la souche MMS 151 a été sélectionnée parmi les 13. Cette sélection est justifiée par le fait que cette souche a révélé une production de peptaïbols courts et longs (11 et 20 résidus) suite à l'analyse qualitative de sa production. Ainsi, la méthode d'extraction sera optimale pour tous les peptaïbols confondus, quelque soit leur longueur.

Par la suite, l'étude de la cinétique de production des peptaïbols est réalisée avec cette souche MMS 151 pour les mêmes raisons.

2.2. Spectromètres de masse utilisés pour l'analyse qualitative

2.2.1. LCQ™

Le profil de production des peptaïbols présents dans les fractions VLC (90:10; v/v) a été déterminé sur le LCQ™. Les échantillons ont été injectés à une concentration de 0,5 µg/mL, en perfusion, à un débit de 3 µL/min dans la source de l'appareil. Les concentrations des échantillons sont inférieures à celles utilisées sur l'IT-TOF car ici il s'agit d'une injection directe dans la source du spectromètre de masse. Il n'y a donc pas de dilution de l'échantillon lors de son injection comme c'est le cas en FIA.

2.2.2. Simple quadripôle

Les 2 premiers spectromètres de masse ont déjà été décrits dans la partie « matériel et méthode général » du manuscrit, mais pour les travaux décrits dans ce chapitre un analyseur de masse quadripolaire présent au laboratoire IFREMER de Nantes a également été utilisé pour compléter l'étude comparative des résultats.

Le spectromètre de masse simple quadripôle (Figure 5-1) est équipé d'une source electrospray, fonctionnant comme celle décrite pour le LCQ™ dans la partie « matériel et méthode général » de ce manuscrit. Il est composé de 4 électrodes de section circulaire soumises deux à deux à des potentiels positifs ou négatifs composés d'une tension continue et d'une tension alternative.

Les ions provenant de la source arrivent dans l'analyseur et sont soumis au champ quadripolaire. Suivant les valeurs des différentes tensions appliquées, certains ions vont adopter des trajectoires stables et seront alors guidés vers le détecteur (un multiplicateur d'électrons). Les trajectoires oscillantes des ions sont soumises aux équations de Mathieu (Paul *et al.*, 1958).

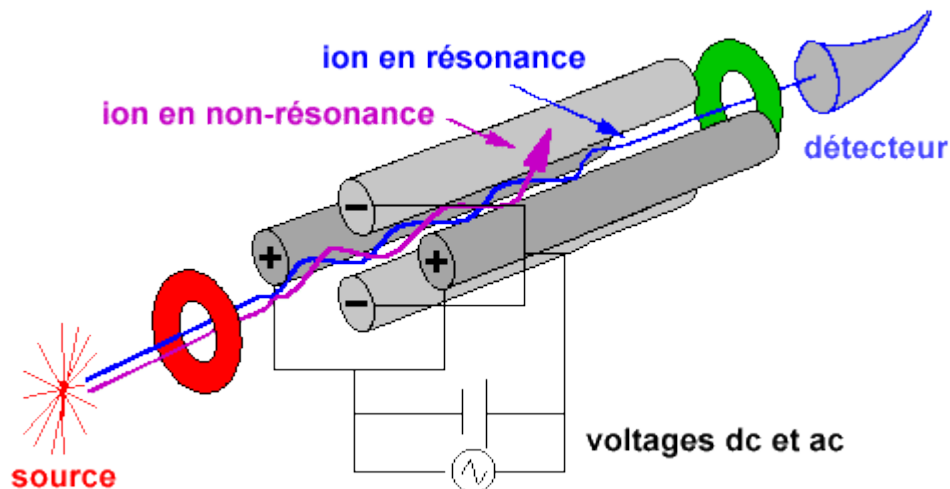


Figure 5-1 : Schéma de l'analyseur de masse quadripolaire, d'après le site web gcms.free.fr (www.gcms.free.fr, 2006)

Ce spectromètre de masse étant moins sensible que le LCQ™, la concentration des échantillons injectés a dû être augmentée et le débit optimisé afin d'obtenir une bonne détection des analytes. Les échantillons ont donc été injectés à des concentrations de 10 µg/mL, en perfusion, avec un débit de 10 µL/min.

2.2.3. IT-TOFMS

L'injection de fractions VLC (90:10; v/v) à 10 µg/mL des extraits bruts des différentes souches citées précédemment a été réalisée en FIA (flow injection analysis) sur la chaîne HPLC-ESI-IT-

TOFMS. L'échantillon est injecté à un débit de 0,2 mL/min sur la chaîne de chromatographie liquide haute performance (HPLC) avant d'être analysé par le spectromètre de masse (MS).

2.3. Solvants utilisés pour l'optimisation de l'extraction des peptaïbols en vue de leur analyse quantitative

L'efficacité du protocole d'extraction des peptaïbols à partir de la biomasse fongique de *Trichoderma* a été évaluée afin de choisir le solvant ou mélange de solvants assurant la meilleure extraction possible. La souche étudiée dans cette partie est *T. longibrachiatum* (MMS 151), cultivée sur milieu DCA/eau de mer. Plusieurs solvants ou mélanges de solvants ont été testés pour l'extraction de la biomasse fongique récoltée après mise en culture. Les peptaïbols présentant une polarité moyenne, les solvants ont été choisis en tenant compte de cette caractéristique physico-chimique.

- CH₂Cl₂/Méthanol (MeOH) (1:1, v/v)
- Acétate d'éthyle (AcOEt)
- n-butanol
- Acétone/acide acétique 1% (CH₃COOH)
- CH₂Cl₂/AcOEt (1:1, v/v)

La macération de la biomasse fongique pendant 2 h dans les différents solvants ou mélanges de solvants a été réalisée sous agitation magnétique. L'analyse quantitative des peptaïbols contenus dans les extraits bruts a ensuite été menée en suivant la méthode décrite et validée dans la partie correspondante de ce chapitre (3.2).

2.4. Mode de détection et paramètres instrumentaux utilisés pour l'analyse quantitative

Dans le cas de l'analyse quantitative des peptaïbols, les ions caractéristiques des séquences habituellement produites ont été suivis sur le LCQ™ par un mode sans fragmentation, en full scan, sur une gamme de rapports m/z de 150 à 2000 pour avoir la plus large gamme de rapports m/z disponible sur l'appareil. Le logiciel de retraitement des données permet ensuite d'extraire précisément le chromatogramme correspondant à un ion ciblé.

La sensibilité de détection des ions d'intérêt réside dans la bonne optimisation des paramètres du spectromètre de masse. Une optimisation automatique des paramètres de la source, du système de transmission et de la trappe ionique a été réalisée sur un ion caractéristique d'une séquence du peptaïbol à 14 résidus (bergofongine D), utilisé comme standard pour la quantification des peptaïbols à longueur de chaîne moyenne. Le choix de ce standard comme base de l'optimisation des réglages de l'appareil a été fait car la masse caractéristique de cet ion est proche de la médiane de la gamme des masses étudiées ($m/z \approx 600$ à 2000 pour les adduits sodium des peptaïbols). Cette optimisation a permis une augmentation du signal de détection pour cet ion et pour les ions de rapport m/z proches.

3. Analyse qualitative de la production de peptaïbols par différentes souches de *Trichoderma* : influence de l'appareillage utilisé

Au sein d'une même espèce de *Trichoderma*, le profil de production de peptaïbols des souches fongiques semble similaire (Ruiz *et al.*, 2010). Afin de confirmer que le profil de production d'une souche ne dépend pas du spectromètre de masse utilisé, l'injection directe de fractions (90:10; v/v) purifiées par chromatographie liquide sous vide (VLC) des extraits bruts de plusieurs souches de *Trichoderma* a été réalisée sur 3 appareils différents. Cette étude a également permis d'évaluer qualitativement la production de peptaïbols des souches sélectionnées.

Pour l'ensemble des extraits VLC des 13 souches étudiés, les mêmes allures de profils de production de peptaïbols ont pu être observées en utilisant les 3 analyseurs de masse ayant des technologies différentes (Figure 5-2).

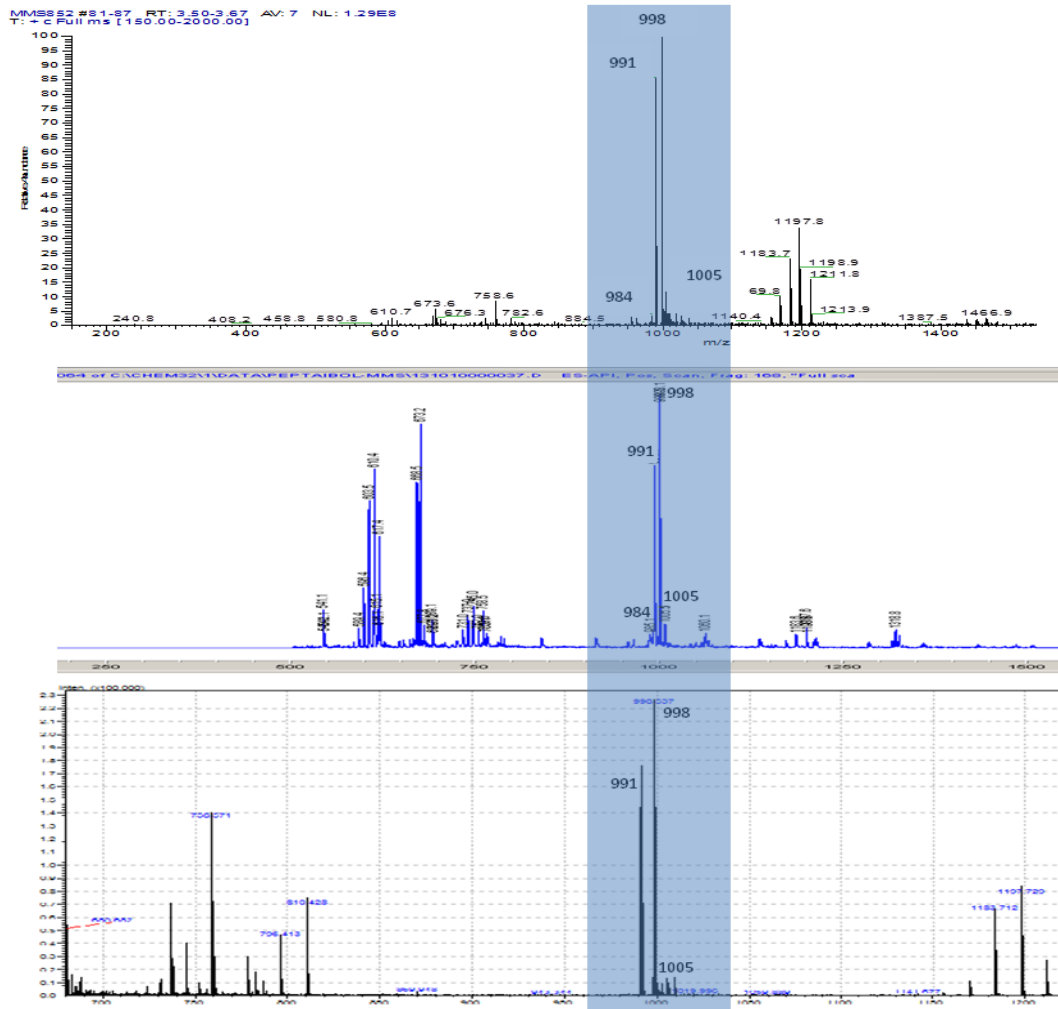


Figure 5-2 : Spectres de masse full scan de l'extrait VLC (90:10; v/v) de la souche MMS 852 (*T. harzianum*). Profil observé sur les spectromètres de masse a) LCQ™, b) simple quadripôle, c) IT-TOF.

La Figure 5-2 montre le cas de figure de la souche MMS 44. Sur tous les spectres de masse, les rapports m/z correspondants aux masses des ions caractéristiques des peptaïbols produits par cette souche apparaissent. Les ions les plus visiblement détectés sont sous la forme d'adduits sodium bi-chargés, et correspondent à des peptaïbols à 18 résidus classiquement produits par cette espèce de *Trichoderma*. Ce type de résultats a été obtenu pour l'ensemble des souches étudiées.

Le profil d'abondance des rapports m/z de chaque groupe de peptaïbols produits par une souche de *Trichoderma* peut être observé en zoomant sur le massif d'intérêt comme cela a été réalisé sur la Figure 5-2 qui montre l'exemple de la souche MMS 775.

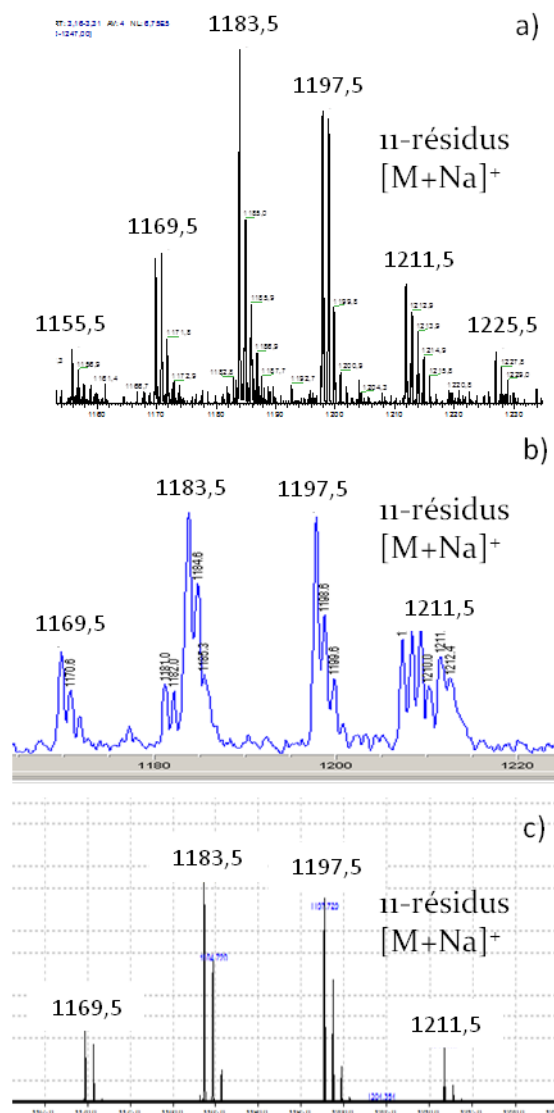


Figure 5-3 : Spectres de masse zoomés sur les masses caractéristiques des peptaïbols à 11 résidus de l'extrait VLC (90:10; v/v) de la souche MMS 755 (*T. capillare*). Profil observé sur les spectromètres de masse a) LCQTM, b) simple quadripôle, c) IT-TOF.

Le même profil, ainsi que des rapports d'abondance entre chaque pic similaires sont observés après acquisition des données avec les trois appareils pour chacune des 13 souches étudiées.

Ceci permet d'affirmer qu'un profil de masse caractéristique et stable existe pour chaque souche de *Trichoderma*, quel que soit l'appareillage utilisé pour l'analyse qualitative. Des similitudes de profils de production étant observées au sein d'une espèce (Ruiz *et al.*, 2010), le

profil massique de production en peptaïbols obtenues pour une souche inconnue peut permettre l'identification de espèce à laquelle elle appartient (chimiotaxonomie).

La production qualitative de peptaïbols de chaque souche déterminée grâce à la spectrométrie de masse est présentée dans le tableau suivant.

Tableau 5-1 : Production qualitative des peptaïbols par les 13 souches de *Trichoderma* choisies

Souche	Espèce	Production de peptaïbols
MMS 13	<i>T. harzianum</i>	11-, 14-, 18-res
T22 (ATCC 20847)	<i>T. harzianum</i>	11-, 14-, 18-res
MMS 1255	<i>T. sp. S466</i>	11-, 14-, 15-res
MMS 1541	<i>T. pleuroticola</i>	11-, 14-, 18-res
MMS 19	<i>T. citrinoviride</i>	11-, 20-res
MMS 58	<i>T. longibrachiatum</i>	11-, 20-res
MMS 151	<i>T. longibrachiatum</i>	11-, 20-res
MMS 510	<i>T. reesei</i>	11-, 20-res
MMS 755	<i>T. capillare</i>	11-, 20-res
MMS 852	<i>T. capillare</i>	11-, 20-res
MMS 975	<i>T. ghanense</i>	11-, 20-res
MMS 639	<i>T. atroviride</i>	11-, 17-, 19-res
MMS 927	<i>T. atroviride</i>	11-, 17-, 19-res

Le tableau présenté ci-dessus montre qu'une production similaire des classes de peptaïbols est observée pour une même espèce de *Trichoderma*, confirmant ainsi les résultats obtenus par Ruiz *et al.* en 2010. De plus, au sein d'un même clade, les mêmes classes de peptaïbols sont également produites. En effet, par exemple, *T. pleuroticola* et *T. harzianum* sont 2 espèces faisant partie du même clade (Neuhof *et al.*, 2007) et ils produisent les mêmes sous-groupes de peptaïbols, mais avec des profils en spectrométrie de masse différents (Figure 5-4). A noter que la souche MMS 1255, dont l'espèce est nouvellement décrite fait partie du complexe d'espèce « *T. harzianum complex* » (Jaklitsch and Voglmayr, 2015).

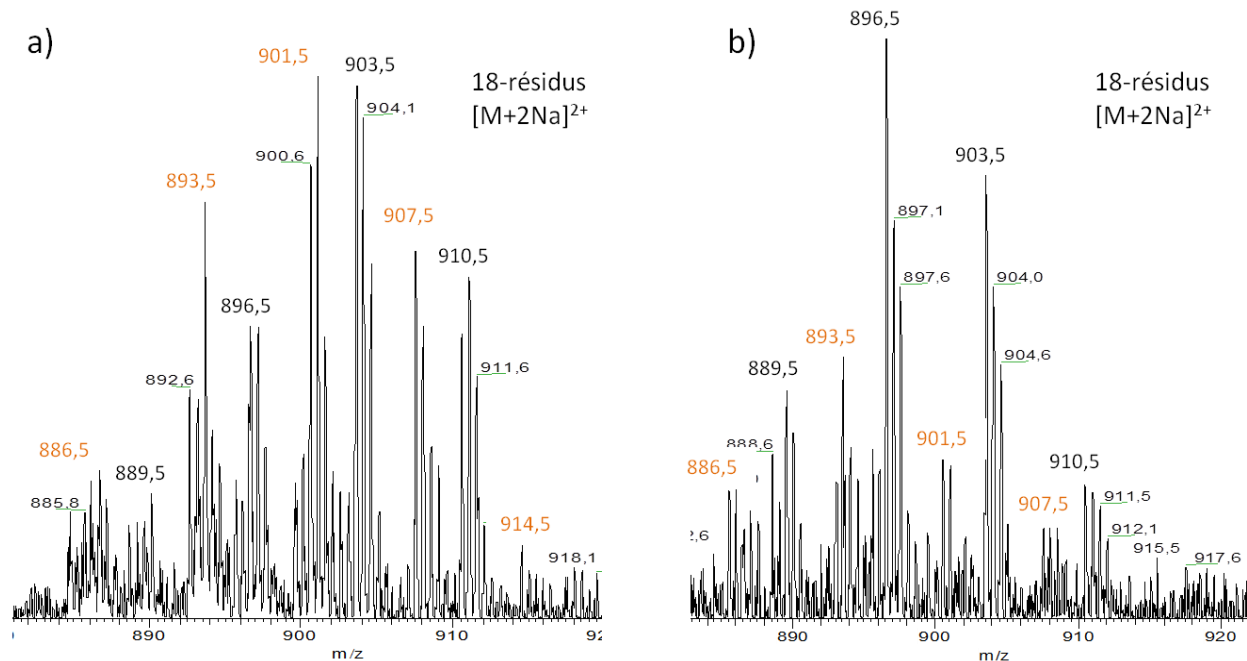


Figure 5-4 : spectres de masse zoom scan de la région des peptaïbols à 18 résidus observés sur le spectromètre de masse LCQ™ pour a) MMS 13 (*T. harzianum*) et b) MMS 1541 (*T. pleuroticola*). Une série d'ions caractéristiques est repérée par une couleur de m/z .

Comme le montre la Figure 5-4, les 2 souches produisent 2 séries différentes de peptaïbols à 18 résidus (indiquées par les couleurs orange ou noir) mais dans des proportions différentes. En effet, les abondances relatives des pics correspondants aux différents rapports m/z d'une série d'ions caractéristiques des peptaïbols à 18 résidus ne sont pas identiques entre les 2 souches d'espèces différentes. Ceci confirme également qu'il serait possible de déterminer l'espèce d'une souche de *Trichoderma* en se basant sur son profil massique de production de peptaïbols.

Après cette partie portant sur l'analyse qualitative des peptaïbols produits par les 13 souches de *Trichoderma* sélectionnées, une étude quantitative a été menée grâce au couplage d'une chaîne HPLC avec le spectromètre de masse LCQ™.

4. Analyse quantitative des peptaïbols dans les extraits bruts de *Trichoderma*

4.1. Optimisation de l'extraction des peptaïbols

D'après la loi des mélanges, la polarité d'un mélange de solvant peut se calculer en pondérant les polarités de solvants par les fractions volumiques de ces solvants. Soit, pour un mélange en volumes V_a et V_b de 2 solvants A et B de polarités P_a et P_b , la polarité du mélange, notée P , sera exprimée comme suit :

$$P = \frac{P_a V_a + P_b V_b}{V_a + V_b}$$

Le Tableau 5-2 présente les polarités obtenues pour les différents solvants et mélanges de solvants utilisés pour l'extraction des peptaïbols à partir de la biomasse fongique.

Tableau 5-2 : Polarité des solvants et mélanges de solvants utilisés pour l'extraction des peptaïbols

Solvants mélanges	et $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (1:1)	n-Butanol	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1)	AcOEt	Acétone/ CH_3COOH 1%
Polarité	3,8	4,0	4,1	4,4	5,1

Etant donné les résultats d'analyse qualitative, les peptaïbols à 11 et 20 résidus ont été quantifiés dans les extraits bruts de la souche MMS 151. Les masses en peptaïbols rapportées à la masse de la biomasse fongique extraite avec les différents solvants ou mélanges de solvants testés sont présentées Figure 5-5.

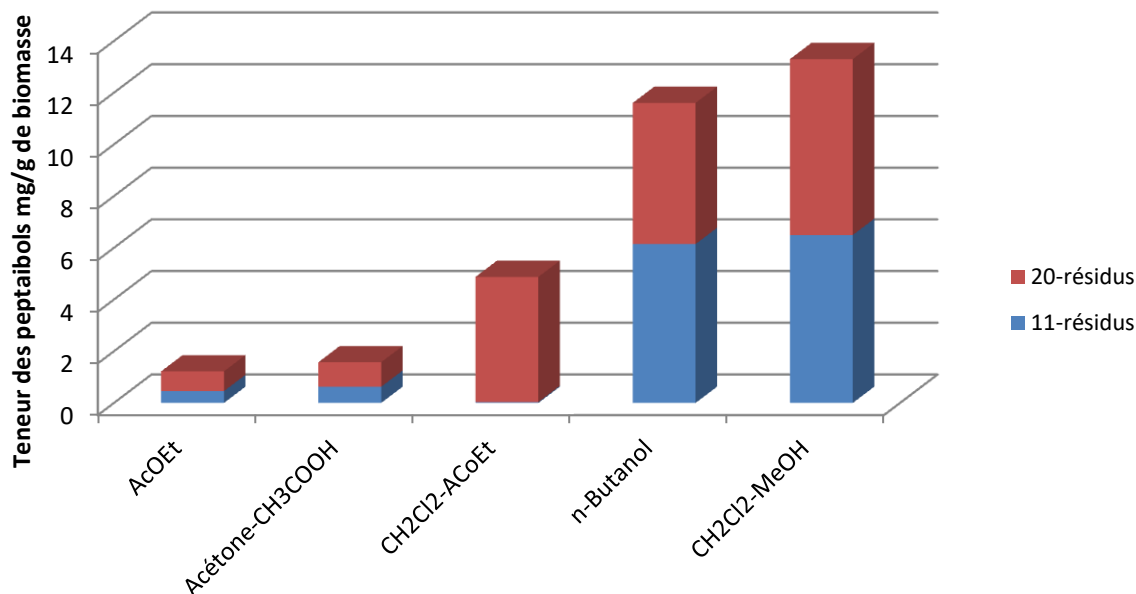


Figure 5-5 : Masses des peptaïbols rapportées à la masse de la biomasse fongique fraîche extraite en fonction du solvant ou du mélange de solvant utilisé pour l'extraction.

Les résultats montrent que le solvant ou mélange de solvants permettant d'extraire le plus de peptaïbols est le mélange CH₂Cl₂/MeOH (1:1, v/v). En effet, la teneur en peptaïbols extraits est la plus importante avec plus de 12 mg/g de biomasse fraîche. Le n-butanol est un solvant qui donne de bonnes teneurs d'extraction également mais inférieures au mélange précédent. De plus, il est relativement difficile à évaporer, ce qui serait problématique lors de la récupération de l'extrait brut. Ces 2 mélanges ont des polarités très proches (4,1 et 4,0 respectivement ; Tableau 5-2), ce qui peut expliquer la similitude de leur efficacité d'extraction. Le mélange CH₂Cl₂/AcOEt (1:1, polarité de 3,8) semble ne pas extraire les peptaïbols à 11 résidus, pourtant les moins polaires. Ce mélange semble pourtant avoir une efficacité proche de celle du n-butanol pour l'extraction des peptaïbols à 20 résidus. L'AcOEt et le mélange acétone/CH₃COOH 1% ne semblent pas être efficaces pour l'extraction des peptaïbols, sans doute en raison d'une polarité supérieure.

Afin d'augmenter encore l'efficacité d'extraction des peptaïbols dans la biomasse fongique fraîche, 2 extractions successives seront finalement réalisées. Le mélange de solvant choisi sera d'abord utilisé en proportion 1:2 (v/v) pour une première macération de la biomasse fongique

pendant 2h, puis en proportion 2:1 (v/v) pour une deuxième macération de la même biomasse pendant 2h également. Ce choix d'une double extraction a été fait afin d'améliorer l'extraction des peptaïbols et d'étendre au maximum le domaine de polarité des solvants pour en extraire une quantité plus importante. Un lavage à l'eau distillée permet ensuite de faire migrer les peptaïbols dans la phase dichlorométhane.

4.2. Validation de la méthode de quantification et utilisation- *Publication 3*

La méthode mise au point pour le dosage des peptaïbols dans les extraits bruts de *Trichoderma* à ensuite été validée en suivant les recommandations de la food and drug administration (FDA). La démarche, les résultats obtenus et l'utilisation de la méthode de quantification ont fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Chromatography B*, présentée dans les pages suivantes.



Development and validation of LC–MS methods for peptaibol quantification in fungal extracts according to their lengths



Anne-Isaline Van Bohemen^a, Aurore Zalouk-Vergnoux^{a,*}, Laurence Poirier^a, Nam Ngoc Phuong^a, Nicolas Inguibert^b, Khoubaib Ben Haj Salah^b, Nicolas Ruiz^a, Yves François Pouchus^a

^a University of Nantes, MMS, EA 2160, F-44000 Nantes, France

^b UPVD, University of Perpignan, CRIOBE—USR CNRS 3278, F-66860 Perpignan, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2015

Received in revised form 20 October 2015

Accepted 21 November 2015

Available online 4 December 2015

Keywords:

Trichoderma sp

Peptaibols

LC/ESI-IT-MS

Quantification

Validation

Biocontrol

ABSTRACT

Some terrestrial *Trichoderma* sp. strains are already used as biological control agents (BCAs). They all produce peptaibols, small antimicrobial peptides which are supposed to play a role in the anti-phytopathogenic activity of *Trichoderma* sp. *Trichoderma* strains producing high amounts of peptaibols could represent new potential BCAs. In this context, marine-derived *Trichoderma* strains from the marine fungal strain collection of the “Mer, Molécules, Santé” (MMS) laboratory were investigated for their peptaibol production. Previously, the quantification of peptaibols was performed using alamethicin, as standard (20-amino acid residues peptaibol). In this study, the development and validation of quantification LC/ESI-IT-MS methods using different standards of peptaibols (11-, 14- and 20-amino acid residues) was performed in order to quantify all of them, in a single analysis, in *Trichoderma* crude extracts according to their chain length. The developed and validated methods were used to study the peptaibol production kinetic of a marine-derived *Trichoderma* strain, i.e., *Trichoderma longibrachiatum* (MMS 151). The results showed the optimal culture time at the 9th day with concentrations reaching $1.4 \pm 0.2\%$ and $2.3 \pm 0.4\%$ of the fungal biomass respectively for 11- and 20-residue peptaibols. Then, the different peptaibol subgroups produced by 13 *Trichoderma* strains were quantified. According to their 18-, 19- and 20-residue peptaibol production, three strains referenced as MMS 1541, MMS 639 and MMS 151 seemed to be good candidates as potential new biological control agents with respective production of 0.4, 0.4 and 2.1%.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

During the last 20 years, the reduction of pesticide uses in crops has become a necessity for health protection and prevention. The search of alternative fungicides for the ornamental plants is becoming strategic. For example, phytosanitary products will be forbidden in the French public green spaces from 2020 (French program Plan Ecophyto 2018: (<http://agriculture.gouv.fr/sections/magazine/focus/phyto-2018-plan-pour/#planECOPHYTO2018>)).

Some terrestrial *Trichoderma* sp. strains are already used as biological control agents (BCAs) [1]. An antagonistic action of these strains was highlighted on several phytopathogens like *Fusarium*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Verticillium* or *Botrytis* [2]. *Trichoderma* strains are also used as plant growth-promoting agents. In fact, their use is

recommended for cultivation of vegetables and ornamental plants, for plant and tree nursery and should lead to: (i) prophylactic protection of plants and scions against soil-borne plant pathogenic fungi; (ii) stimulation of root growth, including a higher percentage of root hairs; (iii) increased yield due to improved germination and rooting rates; (iv) increase of plant dry weight and number of flowers; (v) earlier onset of flowering and shortening of cultivation periods [2].

All *Trichoderma* strains produce peptaibols which are small linear antimicrobial peptides, characterized by molecular masses ranging from 500 to 2000 Da, thus containing 5–20 residues and a high amount of α -amino-isobutyric acid (Aib or U) [3]. They possess an acylated N-terminus and a C-terminus amino-acid residue reduced in amino-alcohol [4]. Peptaibols form a subgroup in the larger family called peptaibiotics [3,5,6]. Peptaibiotics have been studied for their potential biological activities particularly in the context of the alternative sources of antibiotics research [7] and as new therapeutic agents [8]. They had been shown to exhibit

* Corresponding author at: Université de Nantes, 44035 Nantes, Cedex 1, France.
E-mail address: aurore.zalouk-vergnoux@univ-nantes.fr (A. Zalouk-Vergnoux).

a wide range of biological activities including an antibacterial activity against *Gram-positive* bacteria [9–11], as well as dormant mycobacteria [12,13] and an antifungal activity [10]. They have also been widely studied for their potential use as biocontrol agents against plant fungal pathogens [14–16]. They have been reported to have an antiviral activity, particularly against infections caused by the virus of tobacco mosaic [17–19], and an antiparasitic activity against amoebae (*Dictyostelium* sp.) [20] and protozoa (*Plasmodium falciparum*) [21]. Peptaibols are supposed to play a role in the anti-phytopathogenic activity of *Trichoderma* sp. [15,22]. If they are long enough, they are able to form voltage-dependent ion channels in the lipid membranes [23,24]. Consequently, *Trichoderma* strains producing high amounts of long-chain peptaibols (18–20-residues) could represent potential new BCAs. Moreover, peptaibols could have not the same efficiency according to the targeted phytopathogen. It thus necessary to quantified separately each produced peptaibol subgroups in order to select the most efficient *Trichoderma* strain to inhibit the targeted pathogen.

Peptaibols could be classified according to their amino acids chain length and are produced in microheterogeneous mixtures. The main subgroups are 11-, 14-, 18-, 19- and 20 amino acid residue peptaibols [25]. Until now, the LC-MS quantifications of peptaibols have been performed using alamethicin, as standard [26,27]. Currently, all peptaibol subgroups (11-res-20-res peptaibols) were quantified using only one standard: the commercial alamethicin mixture. Commercial alamethicin is a mixture of four 20-residue peptaibols, being the only current peptaibol commercialized mixture. Moreover, according to the study from Degenkolb, this commercial mixture contain a mycotoxin: the trichothecene [28]. In the present study a LC/ESI-IT-MS methods was developed using different standards of peptaibols (11-, 14- and 20-residues) to quantify each peptaibol subgroup separately. It seems necessary to use standards with different chain lengths since they probably lead to different ionizations in the mass spectrometer (ESI-IT) and consequently to different sensitivities.

In the present study, after development and validation of the analytical methods of the quantification of the different peptaibol subgroups, 12 marine-derived *Trichoderma* strains of the marine fungal strain collection of the laboratory were screened in order to select the best potential BCAs.

2. Experimental

2.1. Chemical

Dichloromethane (CH_2Cl_2) and methanol (MeOH) used for peptaibol extractions and purifications were purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France) and distilled prior to use. The HPLC quality grade methanol for MS analyses was obtained from Biosolve (Valkenswaard, Netherlands).

2.2. Peptaibol standards

Alamethicin F50/5, hypomurocin A-III and a bergofungin D analogue were synthesized using microwave-assisted one shot synthesis according to the protocol of Ben Haj Salah and Inguibert [29]. They are respectively named PEP-20 (20-residue peptaibols), PEP-11 (11-residue peptaibols) and PEP-14 (14-residue peptaibols) in this paper. Hypomurocin A-III (PEP-11) was observed in *Hyphocrea muroina* [30] and the similar sequence of bergofungin D (PEP-14) isolated from *Emericellopsis donezki* [31] contain proline residues in positions 9 and 12 instead of hydroxyproline. Their sequences are:

PEP-11: AcUQVLUPLLUPLol
PEP-14: AcVUUVGLUUPQUPUFol

PEP-20: AcUPUAUAQUVUGLUPVUUQQFol
Q = Glutamine V = Valine U = Aib P = Proline L = Leucine
A = Alanine F = Phenylalaninol Lol = Leucinol G = Glycine.

2.3. Fungal strains

Twelve marine-derived and one commercial strain of *Trichoderma* sp. were selected for this study. Their specificities are given in Table 1. Their qualitative peptaibol productions have been determined using mass spectrometry analyses in infusion mode as described by Carroux et al. [32].

2.4. Culture

Strains were inoculated onto Petri dishes (10-cm diameter) containing 20 mL of DCA medium (Dextrose 40 g/l, enzymatic digest of Casein 10 g/l, Agar 15 g/l, DIFCO, France) prepared with reconstituted seawater. Cultures were incubated in natural light at 27 °C.

2.5. Extraction and purification

After incubation, mycelia and conidia were scraped from the agar surface. The harvested biomass was steeped twice in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:2 then 2:1 (v/v, 30 mL total volume) for 30 min at room temperature. The combined extracts were filtered, washed with distilled H_2O (20 mL) and evaporated to dryness to provide crude extracts.

2.6. LC-MS analysis

The samples were analyzed using a high performance liquid chromatography (HPLC) system consisting on a spectraSYSTEM P1000XR pump, a spectraSYSTEM AS3000 as autosampler (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a Kromasil-C18 5 μm 250 mm $\times$ 2 mm column (Interchim, France) heated at 40 °C. The autosampler was maintained at room temperature and was programmed to inject 5 μL of sample in the chromatographic column. The mobile phase consisted on a $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ mixture (85:15, v/v) in isocratic mode at a constant flow rate of 0.2 mL/min. Mass analyses were performed using a Finnigan Matt LCQTM ESI-IT mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) in positive ionization mode with a capillary temperature of 160 °C, a capillary voltage and a spray voltage of 3 V and 4.50 kV, respectively. Nitrogen flow rates were 60 and 0 (arbitrary units) respectively for sheath gas and auxiliary gas. The parameters of ion optic transmission were 50 V, –3.25 V, –5.5 V and 400 V for tube lens offset, multipole 1 offset, multipole 2 offset and multipole RF amplifier respectively.

Analyzed under neutral conditions and in positive mode by electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry (ESI-IT-MS), long chain peptaibols appear principally as doubly charged sodium adduct ions $[\text{M} + 2\text{Na}]^{2+}$ and short chain peptaibols appear as singly charged sodium adduct ions $[\text{M} + \text{Na}]^+$. All data acquisitions and reprocessings were performed using LCQ Xcalibur 1.3 software (Thermo Fisher Scientific). For each standard, the analyzed ions were:

- PEP-11: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 1197$
- PEP-14: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 1417$ and $[\text{M} + 2\text{Na}]^{2+} = 720$
- PEP-20: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 1985$ and $[\text{M} + 2\text{Na}]^{2+} = 1004$.

Concerning the peptaibols produced by *Trichoderma* sp., the expected diagnostic ions of each subgroup are presented in Table 2.

The short chain peptaibols were quantified using the standard calibration curve performed with PEP-11 and PEP-14 for 11- and 14-residue peptaibols respectively. The long-chain peptaibols

Table 1
Trichoderma strain descriptions, origins and putative peptaibol productions.

Strain	Species	Isolated from	Geographical origin	GenBank accession number	Putative peptaibol subgroups
MMS 13	<i>T. harzianum</i>	Cockles	Le croisic	JQ653065	11-, 18-res
MMS 19	<i>T. citrinoviride</i>	Cockles	Le croisic	JQ608473	11-, 20-res
MMS 58	<i>T. longibrachiatum</i>	Mussels	La tara	JQ653055	11-, 20-res
MMS 151	<i>T. longibrachiatum</i>	Mussels	Tharon	JQ653057	11-, 20-res
MMS 510	<i>T. reesei</i>	Sediment	La couplasse	GU947793	11-, 20-res
MMS 639	<i>T. atroviride</i>	Seawater	La couplasse	JQ653056	11-, 17-, 19-res
MMS 755	<i>T. capillare</i>	Sediment	Le collet	JQ653068	11-, 20-res
MMS 852	<i>T. capillare</i>	Sediment	Port-Giraud	JQ653070	11-, 20-res
MMS 927	<i>T. atroviride</i>	Sediment	Le croisic	GU947796	17-, 19-res
MMS 975	<i>T. ghanense</i>	Sediment	Le croisic	GU947792	11-, 20-res
MMS 1255	<i>T. harzianum</i>	Sediment	Port du bec	JQ653081	11-, 14-res
MMS 1541	<i>T. pleuroticola</i>	Cockles	Bonne anse	JQ653064	11-, 14-, 18-res
T22 (ATCC 20847)	<i>T. harzianum</i>	Commercial BCA	–		11-, 14-, 18-res

Table 2
Characteristic target $[M + Na]^+$ or $[M + 2Na]^{2+}$ ions of peptaibol subgroups.

11-res $[M + Na]^+$	14-res $[M + Na]^+$	17-res $[M + 2Na]^{2+}$	18-res $[M + 2Na]^{2+}$	19-res $[M + 2Na]^{2+}$	20-res $[M + 2Na]^{2+}$
1141	1465	824	879	963	
1155	1479	831	882	970	985
1169	1493	832	886	977	992
1183	1506	838	889	984	999
1197	1520	839	893	991	1005
1211	1534	845	896	998	
1225		846	900		
		853	903		
			907		
			910		
			914		
			917		
			925		

(17–20-residues) were quantified using the calibration curve performed with PEP-20.

The quantification of peptaibols according to their length in all samples (standards included) were performed in the same conditions and during a single analysis. Nevertheless, the target ions for the quantification of the peptaibols in crude extracts were not the same than the characteristic ions tracked for the standards PEP-14 and PEP-20. On the contrary, the target ion used for the detection of PEP-11 ($m/z = 1197$) was among the target ions analyzed for the 11-residue peptaibol quantification in crude extracts (Table 2). *Trichoderma* sp. strains potentially produce peptaibols which exhibit the same target ion than the synthesized one, PEP-11, even if the sequences are not the same.

2.7. Method validation

The validation process was conducted according to the guidance for industry bioanalytical method validation, recommended by Food and Drug Administration (FDA) [33].

Co-mingled standards (PEP-11, PEP-14 and PEP-20) were prepared at 6 concentration levels: 0.10; 0.25; 0.50; 0.75; 1.00 and 1.25 $\mu\text{g/mL}$ with HPLC quality grade methanol. The calibration curves were constructed by plotting the chromatographic peaks area versus the corresponding concentrations. The data were fitted using a linear regression with $1/X^2$ weighting factor.

2.7.1. Specificity

Specificity of the methods was determined by analyzing a methanol sample (neat solvent used for the sample preparation) and by comparing it to a calibration level in order to investigate the potential interferences at the retention times of the standards and naturally produced peptaibols. If there is no interfering peak at the

expected retention times for the selected ions, the specificity of the methods will be validated.

2.7.2. Linearity

The linearity was evaluated from 3 injections of the calibration levels of co-mingled standard solutions. A linear model was applied to the triplicates. For each standard, the slope and the y-intercept of the calibration curve were calculated as well as the coefficient of determination. The linearity was considered as satisfactory when the coefficient of determination (R^2) of the calibration curves was higher than 0.999 for each curve [34]. Then, the variance analysis was also performed to validate the linear models in terms of regression and linearity.

2.7.3. LOD and LOQ

The limits of detection (LOD) were defined for each compound as the lowest concentration with a signal-to-noise ratio of 3 and was calculated as $3/S$ (S is the standard deviation of the linear regression and S the slope of the calibration curve) and the limits of quantification (LOQ) were defined as the lowest concentration with a signal-to-noise ratio of 10 and calculated as $10/S$.

2.7.4. Intra-assay precision and accuracy (repeatability)

Three calibration levels (0.50, 0.75 and 1.00 $\mu\text{g/mL}$) were injected 6 times in a single run. The means, the standard deviations, the coefficients of variation (%CV) and the percent deviations of the back calculated concentrations (%bias) were calculated for each standard level. The coefficients of variation of the six injections of each level were considered as acceptable when inferior to 15%. The back calculated concentrations of each level had to be within 15% deviation from the nominal value.

2.7.5. Inter-assay precision and accuracy (reproducibility)

The inter-group accuracy and precision were determined by the injection of a calibration curve per day, at three different days. Each calibration curve was composed of the 6 concentration levels. The means, the standard deviations, the coefficients of variation (%CV) and the percent deviations of the back calculated concentrations (%bias) were calculated for each standard level. The coefficient of variation of the 3 injections of each level should be inferior to 15%. The back calculated concentration of each level had to be within 15% deviation from the nominal value.

2.7.6. Matrix effect

Crude extracts of *Trichoderma longibrachiatum* (MMS151) were spiked before LC/MS analyses with different concentrations of standard solutions to have final concentrations of 0.19, 0.38 and 0.75 µg/mL. Linear regressions were applied to model relative chromatographic areas vs concentrations. These regressions took in consideration the presence of matrix in standard solutions and in order to highlight matrix effect they were compared to the regressions obtained with standards in methanol (0.25, 0.50 and 1.00 µg/mL).

2.8. Evaluation of the sample preparation

The choice of the extracting solvents was done after different tests and by the comparison of the peptaïbol extraction levels from the fungal biomass of the cultured strain *T. longibrachiatum* (MMS 151). The solvent or solvent mixtures involved in the extraction tests were: MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, v/v), ethyl acetate, *n*-butanol, acetone/CH₃COOH 1% and CH₂Cl₂/ethyl acetate (1:1, v/v). The better solvent or solvent mixture was then used for the determination of the sample recoveries and all the other experiments.

The recovery of the extraction protocol was determined for the shortest and the longest-chain peptaïbols, i.e., PEP-11 and PEP-20. The fungal biomass of a *T. longibrachiatum* cultured strain (MMS 151) was separated in 3 equivalent parts (considered as triplicates) and they were spiked with both standards. The peptaïbols were added in order to find a final concentration of 1.00 µg/mL in the sample, considering 100% of recovery. After the biomass extraction and the sample preparation, the concentrations of both standards in the *Trichoderma* crude extracts were determined in the triplicates using the corresponding calibration curves and the recovery values were calculated.

2.9. Application of the validated quantification methods

The quantification of the different peptaïbol subgroups were realized by summing the relative areas of chromatogram peaks obtained with the characteristic ions of each subgroup, then, by determining the corresponding concentrations with the external calibration curve.

2.9.1. Peptaïbol production kinetic study

The fungal strain MMS151 (*T. longibrachiatum*) was chosen to study the peptaïbol production kinetic because it is a strain producing the shortest—and longest-chain peptaïbols, i.e., 11- and 20-residue peptaïbols. This strain were cultured in 36 Petri dishes (10-cm diameter) containing DCA medium. The fungal cultures were harvested in 3 dishes at several times of culture (2,–7, 9, 11, 14, 17, 20, 23 days). Then, the crude extracts and peptaïbols were obtained and analyzed respectively as mentioned above. The optimal culture time for peptaïbol production will be determined.

2.9.2. Peptaïbol production study by *Trichoderma* sp.

Crude extracts of twelve marine-derived and one commercial *Trichoderma* strains were obtained after a culture time of 9 days.

These stains were selected to represent a wide panel of characteristic ions of the peptaïbol subgroups shown in Table 2. Extraction, sample preparation and analyses were performed as explained above. The peptaïbol production of these stains will be determined according to the length of chain of peptaïbols by the LC–MS validated methods.

3. Results and discussion

3.1. Method validation

3.1.1. Specificity

No chromatographic peaks of characteristic ions of PEP-11, PEP-14 and PEP-20 were detected at their respective retention times in methanol.

3.1.2. Linearity

The linear regressions, the slopes, the y-intercepts and the determination coefficients (R^2) for each standard (PEP-11, PEP-14 and PEP-20) are shown in Fig. 1.

The R^2 values calculated for the 3 standards were higher than 0.98. They are consequently considered as acceptable since the linear regressions were built with 3 different injections of calibration levels. Moreover, variance analyses validated the linear models of the three regressions performed with PEP-11, PEP-14 and PEP-20. The same results were observed for all of them: $F_{reg} < F_{table}$ with $p < 0.0001 \Rightarrow$ significant regression and $F_{nl} > F_{table}$ with $p < 0.0001 \Rightarrow$ the linear model can be applicable. The responses relative area/concentration were different according to the length of the peptaïbol standards. These differences were probably due to different ionization of the standards. The ionization of the peptaïbols seems to decrease with the length of their residue chain, leading to a quantification method sensitivity of 11-residue peptaïbol (PEP-11) significantly higher than those of the longer peptaïbols (14- and 20- residue). Then, the quantification method sensitivity is higher for 14-residue peptaïbols compared to 20-residue peptaïbols but the difference is not as great as compared to 11- residue peptaïbols. These results show that an appropriated calibration is needed in function of the peptaïbol chain length. The calibration curve of PEP-20 was chosen to quantify the 17–20-residue peptaïbols. It seemed to be more adapted since all the longest peptaïbols present structural similarities compared to the shortest ones. For example, shortest peptaïbols (11–14-residues) contain more proline residues than longest ones (17–20-residues) leading to a structural deformation [34].

3.1.3. LOD and LOQ

The calculated LOD were respectively 0.05, 0.02 and 0.06 µg/mL for PEP-11, PEP-14 and PEP-20. The LOQ values were determined as 0.16, 0.07 and 0.22 µg/mL for PEP-11, PEP-14 and PEP-20 respectively. Considering the better sensitivity of PEP-11 quantification method, the obtained LOD and LOQ values seemed high compared to the others. Nevertheless, these results could be attributed to a higher y-intercept for PEP-11 regression probably due to a higher noise of the corresponding target ion.

3.1.4. Intra- and inter-assay precisions and accuracies

Results of intra- and inter-assay precisions and accuracies are given in Table 3. Concerning intra-assay results, the maximum %CV were 6%, 8% and 12%, respectively for PEP-11, PEP-14 and PEP-20. The back-calculated concentrations were within 5%, 7% and 10% of the nominal concentration for all levels of PEP-11, PEP-14 and PEP-20 respectively. About inter-assay results, the maximum %CV were 7%, 11% and 15% for PEP-11, PEP-14 and PEP-20, respectively. The mean percentage deviation of the back calculated concentra-

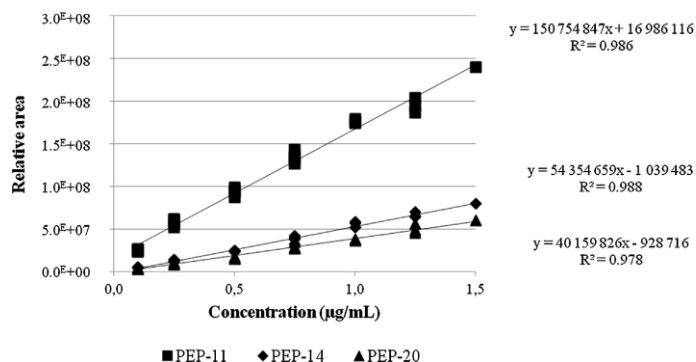


Fig. 1. Linear regressions, equations and determination coefficients of external calibration curves of PEP-11, PEP-14 and PEP-20, respectively 11-, 14- and 20-residue peptaibols injected in triplicates.

Table 3
Results of intra- and inter-assay precisions and accuracies of the LC–MS methods develop to quantify peptaibols in *Trichoderma* crude extracts.

Analyte	Nominal concentration (µg/mL)	Intra-assay (n = 6)			Inter-assay (n = 3)		
		Mean calculated concentration ± SD (µg/mL)	Accuracy (%bias)	%CV	Mean calculated concentration ± SD (µg/mL)	Accuracy (%bias)	%CV
PEP-11	0.25				0.26 ± 0.03	8	7
	0.50	0.51 ± 0.04	5	6	0.52 ± 0.02	4	5
	0.75	0.74 ± 0.05	5	6	0.79 ± 0.04	5	5
	1.00	1.01 ± 0.06	5	6	1.05 ± 0.01	2	2
	1.25				1.21 ± 0.04	5	4
PEP-14	0.10				0.12 ± 0.00	6	9
	0.25				0.25 ± 0.01	2	7
	0.50	0.50 ± 0.03	5	7	0.48 ± 0.01	2	2
	0.75	0.74 ± 0.05	7	8	0.70 ± 0.07	11	11
	1.00	1.00 ± 0.04	4	5	1.05 ± 0.07	8	6
PEP-20	1.25				1.25 ± 0.05	5	4
	0.25				0.25 ± 0.02	8	11
	0.50	0.51 ± 0.04	8	10	0.44 ± 0.03	7	8
	0.75	0.74 ± 0.04	5	6	0.79 ± 0.10	15	12
	1.00	1.01 ± 0.12	10	12	0.97 ± 0.02	2	15
	1.25				1.27 ± 0.13	12	10

SD: standard deviation.

tions were within 8%, 11% and 15% of the nominal concentrations respectively for all levels of PEP-11, PEP-14 and PEP-20.

3.1.5. Matrix effect

The target ions of PEP-11 and PEP-20, respectively $m/z = 1197$ and 1004, were observed in the crude extract of *T. longibrachiatum*, as illustrated in Fig. 2A,C. About the characteristic ion of the standard PEP-11, this result was expectable since the same m/z was reported for 11-residue peptaibols produced by *Trichoderma* sp. Nevertheless, since PEP-11 and the 11-residue peptaibols had not the same sequences, they had not exactly the same retention time (RT). The relative area of the chromatographic peak at $m/z = 1197$ in the crude extract diluted by a factor 2 (RT = 13.24 min, Fig. 2A) represented 25% of the relative area obtained for the two peaks at $m/z = 1197$ in spiked crude extract at 0.75 µg/mL of PEP-11 (RT = 10.91 + 13.24 min, Fig. 2D). About the characteristic ion of PEP-20, the observed ion at $m/z = 1004$ in crude extract was not due to peptaibols produced by *Trichoderma* strains. The relative area of the chromatographic peak of $m/z = 1004$ (RT = 11.26 min, Fig. 2C) was under the method LOD. This unexpected response

could be due to the use of a low resolution mass spectrometer. It do not allow the differentiation of the PEP-20 characteristic ion (monocharged sodium adduct; $m/z = 1004$) and those of 20-residue peptaibols (monocharged sodium adduct; $m/z = 1005$).

About PEP-14, Fig. 2B compared to Fig. 2E show that ion at $m/z = 1417$ was not present in the crude extract since no chromatographic peak was detected. The linear regressions obtained with spiked crude extracts compared to those obtained with standards in methanol allow concluding that no matrix effects exist since the ratios between the slopes were lower than 5% (4%, 2% and 1% for PEP-11, PEP-14 and PEP-20, respectively). Since no matrix effect was revealed, the quantifications of strain production was performed with external calibration. Consequently, there is no peak from any standards which could lead to an error of quantification of strain production.

3.2. Evaluation of sample preparation

The calculated extraction efficiencies from the extracted peptaibol levels of *T. longibrachiatum* strain (MMS 151) showed that

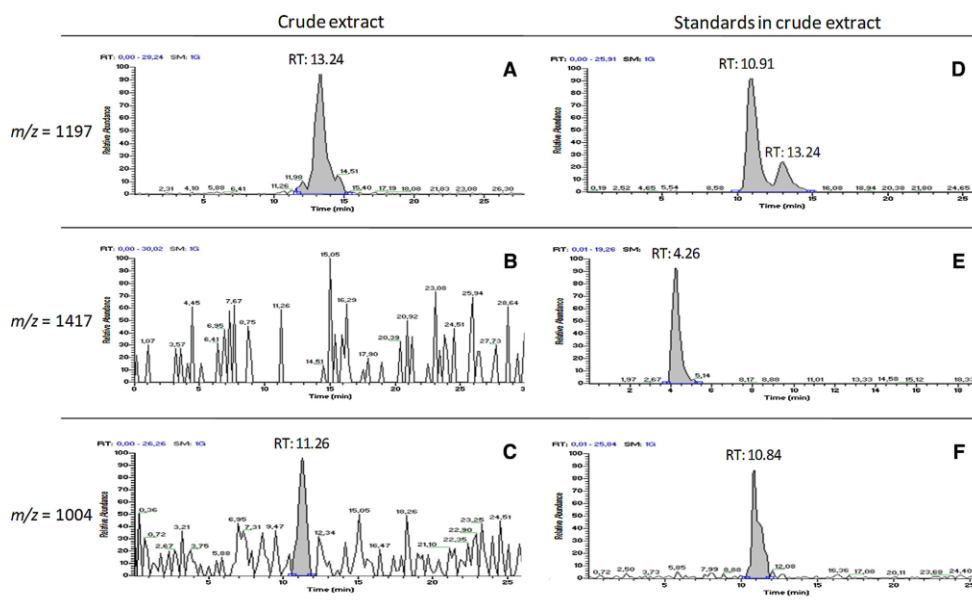


Fig. 2. Chromatograms of crude extract of *Trichoderma longibrachiatum* (MMS 151) and standards (PEP-11, PEP-14 and PEP-20) in methanol (A and D: $m/z = 1197$; B and E: $m/z = 1417$; C and F: $m/z = 1004$).

the more efficient solvent mixture for peptaïbol extraction was MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, v/v). The levels were about 3 times lower for acetone/CH₃COOH 1%, CH₂Cl₂/ethyl acetate (1:1, v/v) and *n*-butanol. With ethyl acetate, the extraction level was more than 6 times lower than with the best solvent mixture. Consequently, MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, v/v) was chosen for the determination of sample recoveries as well as for all the other strain extractions. In order to extract a larger amount of peptaïbols, the extraction were performed with 2 extraction steps involving increased polarity of solvent mixtures, i.e., MeOH/CH₂Cl₂ 1:2 then 2:1 (v/v), corresponding to a final proportion of 1:1.

Recovery values of extraction and sample preparation were $21.1 \pm 5.4\%$ and $31.5 \pm 9.9\%$ for PEP-11 and PEP-20, respectively. These values are not significantly different each other (Mann–Whitney test, $p = 0.05$). Consequently, whatever the peptaïbol subgroups, the extractions could not be considered as different. Even though the recoveries of both standards were not optimal, they were quite consistent and reproducible. The molecules of interest could be lost during the distilled water wash or during the filtration step which would explain the low extraction recoveries. Nevertheless, in this study, the main application of these quantification procedures was to screen strains for their high production of peptaïbols to use them as biological control agents. Consequently, peptaïbols produced in low concentrations were not interesting. An optimization of the extraction recoveries could be needed to response to another problematic. Other solvent mixtures could lead to a better extraction, improving recovery yields.

3.3. Applications of the validated quantification methods

3.3.1. Assignment of target ions to peptaïbol subgroups

The assignment of target ions was achieved with the peptaïbol clades and some sequences described in the literature. Nevertheless, some assignments need to be clarified.

Usually, 14-residue peptaïbols are represented by characteristic ions with m/z lower than 1500 [35,36]. In the present study, m/z values of 1506, 1520 and 1534 were assigned to putative 14-residue peptaïbols (Table 2) because they were observed in a *Trichoderma harzianum* strain, species usually producing 14- and 18-peptaïbols [35]. This assignment will have to be confirmed by a sequencing of these observed ions.

In addition, there is an overlapping zone between the 19- and 20-residue peptaïbol characteristic ions. But a *Trichoderma* strain seems not produce simultaneously 19- and 20-residue peptaïbols [35,37]. Moreover, the peptaïbol subgroup production by *Trichoderma* species can be reported in literature and/or determined by sequencing of the characteristic ions in mass spectrometry. Consequently, the individual quantification of 19- and 20-residue peptaïbols is possible by low-resolution mass spectrometry.

3.3.2. Peptaïbol production kinetic study

The validated methods allowed the quantitative determination of peptaïbol subgroups produced by *Trichoderma* sp. Consequently, they were quantified in *T. longibrachiatum* strain (MMS151) crude extracts during 23 days. MMS151 strain produces 11- and 20-residue peptaïbols [38–40]. Using the quantification methods, 20-residue peptaïbols appeared as singly charged $[M+Na]^+$ and doubly charged $[M+2Na]^{2+}$ whereas 11-residue peptaïbols appeared exclusively as singly charged sodium adducts as shown in Fig. 3.

The 11- and 20-residue peptaïbols were quantified using the method achieved respectively with standards PEP-11 and PEP-20. Fig. 4 shows the mean of 11- and 20-residue peptaïbol proportions in the fungal wet biomass of MMS 151 during the 23 days of the kinetic study. Fig. 4 shows that the trends of both peptaïbol kinetic productions (11- and 20-residues) were similar. Before the 3rd day, the peptaïbol productions were under the limit of quantification of the methods. Then, the productions began from the 3rd day to

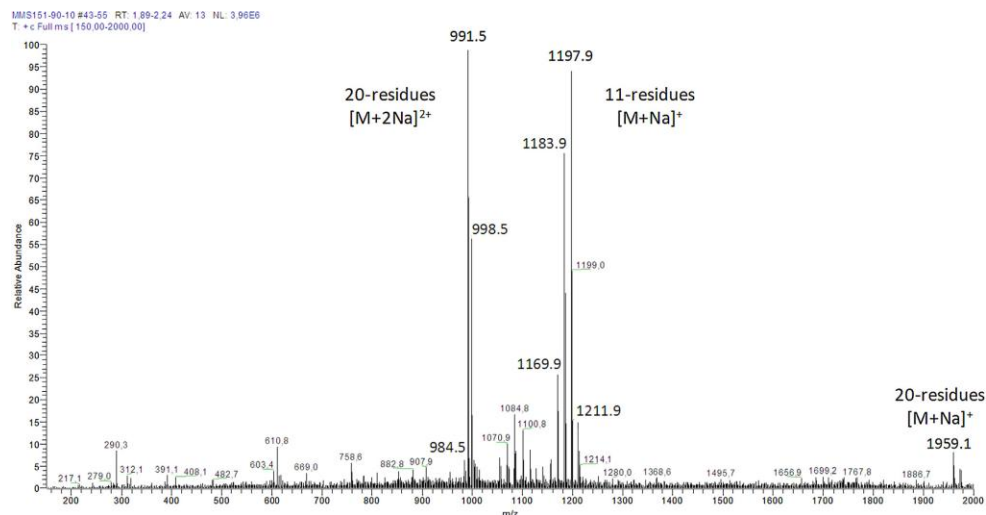


Fig. 3. Mass spectrum of crude extract of *Trichoderma longibrachiatum* strain (MMS151).

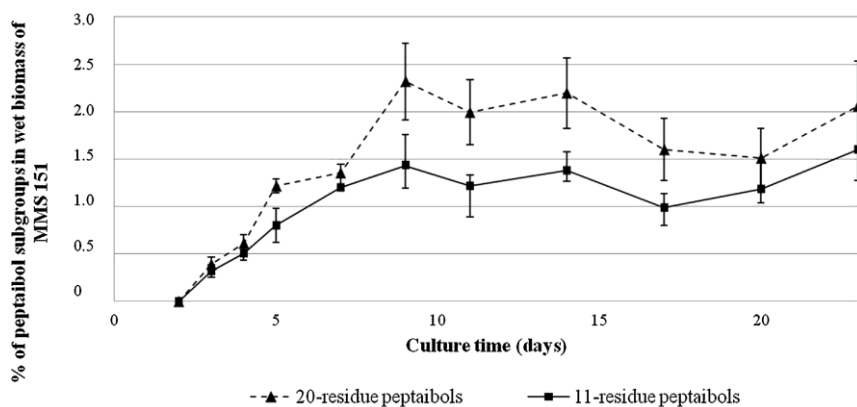


Fig. 4. Mean and standard deviation ($n = 3$) of 11- and 20-residue peptaïbol subgroup proportions, normalized to the wet biomass, during the time.

reach the maximum levels at the 9th day which corresponded to the beginning of a plateau until 23 days. At the 9th day of culture, 11- and 20-residue peptaïbols represented 1.4 ± 0.2 and 2.3 ± 0.4 of the MMS 151 biomass, respectively.

The study of Mikkola et al. [26] also quantified peptaïbols in a *T. longibrachiatum* crude extract by HPLC/ESI-IT-MS. They found two peptaïbol subgroups, i.e., 11- and 20-residues, representing 0.02–0.16% and 0.5–2.6% of the wet biomass at 15 days of culture, respectively. The difference of strains and of broths used for cultures could explain the difference of results with the present study. Mikkola et al., used malt extract agar (MEA) as culture broth whereas MMS 151 was cultured on DCA medium. It is commonly accepted that the culture broth change can lead to a variation of the metabolite productions [41]. Moreover, they quantified some peptaïbols and not the whole subgroups, with alamethicin as standard, whatever the peptaïbol length.

A qualitative kinetic study of trichobrachin (11-residue peptaïbol) production by *Trichoderma parceramosum*, cultivated on MEA medium, was previously achieved by thin layer chromatography (TLC) [42]. Trichobrachins-TBIII production presented a similar trend of 11- and 20-residue peptaïbol productions with detection from the 2nd culture day and a maximum at the 5th culture day.

According to the results shown in Fig. 4, the optimal peptaïbol production was obtained at the 9th day for *T. longibrachiatum* MMS151. From these results and in order to evaluate the peptaïbol productions of the 12 other *Trichoderma* strains (see above), they were cultured during 9 days in DCA medium, even if their optimal peptaïbol production time could be different.

3.3.3. Study of peptaïbol production in *Trichoderma* crude extracts

Consequently, the peptaïbol subgroups in crude extracts of different *Trichoderma* strains were quantified at the 9th day and the

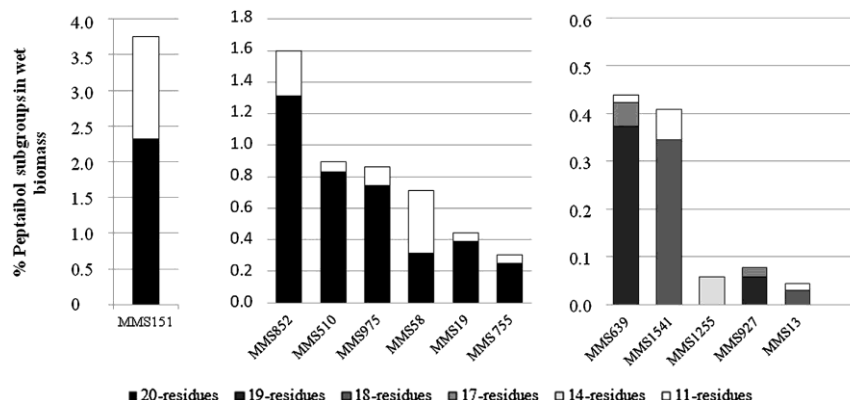


Fig. 5. Proportions normalized to the wet biomass of peptaibol subgroups in 13 *Trichoderma* strains.

results are shown in Fig. 5. The peptaibol subgroup productions fluctuated strain to strain. Usually, when 18-residue peptaibols were produced by some strains, 14-residue peptaibols were also produced. These results were also observed in a previous study [35]. The concerned strains were *T. harzianum* (MMS 13, MMS 1255 and T 22) and *Trichoderma pleuroticola* (MMS 1541), which belongs to the same phylogenetic clade [35,43]. Nevertheless, the productions of 14-residue and 18-residue peptaibols were sometimes too low to reach the LOD of the quantification method, respectively for MMS 13, MMS 1541 and MMS 1255. The peptaibols detected in T22 (*T. harzianum*) crude extracts were under the LOQ of the quantification method (not represented).

The same result was observed for 17-residue peptaibols which were produced together with 19-residue peptaibols by two *T. atroviride* (MMS 639 and MMS 927). An hypothesis was given by Carroux et al. [32], i.e., the 17-residue peptaibols could be truncated 19-residue peptaibols due to an error during the biosynthesis.

The *T. longibrachiatum* strains (MMS 151 and MMS 58) produced high proportions of 20-residue peptaibols. It was also observed for *Trichoderma reesei* (MMS 510), *Trichoderma ghanense* (MMS 975), *Trichoderma citrinoviride* (MMS 19) and *Trichoderma capillare* (MMS 755). From a phylogenetic point of view, these strains are close, i.e., in a same clade [35,43,44].

Concerning the biocontrol purpose, the most interesting strains were those producing long-chain peptaibols. The longest peptaibols are indeed able to form voltage dependent ion channels in the lipid membranes which can lead to the phytopathogen cell death [45]. Moreover, depending on the target pathogen, the peptaibol subgroups could have not the same efficiency. Consequently, the final aim of the quantification would be the selection of the *Trichoderma* strains according to their production of long-chain peptaibols (up to 17-residues). Three strains seemed interesting, i.e., MMS 151, MMS 639 and MMS 1541 for the respective production of 20-, 19- and 18-residue peptaibols. This selection of strains was only based on the peptaibol productions and other information has to be taken into account for their use as biocontrol agents. For example, some *Trichoderma* species, such as *T. longibrachiatum*, are able to cause opportunistic infections in immunocompromised humans [46]. *T. harzianum* could produce mycotoxins [28]. Nevertheless, *Trichoderma* infection in human or animal are quite rare [2] and the use of purified peptaibol mixtures as biocontrol agents could be considered in order to avoid the potential mycotoxin presence.

4. Conclusion

LC-ESI/IT/MS methods were developed and validated for peptaibol subgroup quantification. The analytical responses of the peptaibols were depending on their lengths. The quantification of all the peptaibols by only one standard, classically alamethicin (20-residue peptaibols), may lead to errors, particularly on the shortest-chain peptaibol quantification.

These methods were successfully applied to study a peptaibol production kinetic and to quantify peptaibols in crude extracts produced by *Trichoderma* species. This study permitted to determine the optimal culture time of a *Trichoderma* strain (*T. longibrachiatum*, MMS151) at the 9th day. The different peptaibol subgroup productions were consequently quantified after 9 days of culture in crude extracts to select new potential biocontrol agents. A screening was performed to select the most peptaibol producing strains. However, metabolomics and dereplication studies will be needed to make sure that these marine-derived *Trichoderma* strains do not produce mycotoxins before their potential use as biocontrol agent. Nevertheless, to overcome this problem, the direct use of purified peptaibol subgroups as biocontrol agent could be considered.

Acknowledgements

We are grateful to the platform ThalassOMICS of Biogenouest, to M. Thibault Robiou du Pont for his technical support, to the NABUCO program of the Ecophyto plan of the French Ministry for Agriculture and Food for funding and to the French Ministry for Education and Research for a PhD grant.

References

- [1] A. Schuster, M. Schmoll, Biology and biotechnology of *Trichoderma*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 87 (July (3)) (2010) 787–799, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>, Epub 2010 May 12, 2010.
- [2] T. Degenkolb, K. Fog Nielsen, R. Dieckmann, F. Branco-Rocha, P. Chaverri, G.J. Samuels, U. Thrane, H. von Döhren, A. Vilcinskis, H. Bruckner, Peptaibol, secondary-metabolite, and hydrophobin pattern of commercial biocontrol agents formulated with species of the *Trichoderma harzianum* complex, Chem. Biodivers. 12 (2015) 662–684.
- [3] T. Degenkolb, A. Berg, W. Gams, B. Schlegel, U. Gräfe, The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions, J. Pept. Sci. 9 (2003) 666–678.

- [4] J.K. Chugh, B.A. Walsale, Peptaibols models for ion channels, *Biochem. Soc. Trans.* 29 (2001) 565–570.
- [5] T. Degenkolb, J. Kirschbaum, H. Brückner, New sequences, constituents, and producers of peptaibiotics: an updated review, *Chem. Biodivers.* 4 (2007) 1052–1067.
- [6] T. Degenkolb, W. Gams, H. Brückner, Natural cyclopeptaibiotics and related cyclic tetrapeptides: structural diversity and future prospects, *Chem. Biodivers.* 5 (2008) 693–706.
- [7] H. Duclouhier, Peptaibiotics and peptaibols: an alternative to classical antibiotics, *Chem. Biodivers.* 4 (2007) 1023–1026.
- [8] M. Shi, H.N. Wang, S.T. Xie, Y. Luo, C.Y. Sun, X.L. Chen, Y.Z. Zhang, Antimicrobial peptaibols, novel suppressors of tumor cells, targeted calcium-mediated apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells, *Mol. Cancer* 9 (2010) 26.
- [9] S.U. Oh, B.S. Yun, S.J. Lee, J.H. Kim, I.D. Yoo, Atroviridins A–C and neotroviridins A–D, novel peptaibol antibiotics produced by *Trichoderma atroviride* F80317. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities, *J. Antibiot.* 55 (2002) 557–564.
- [10] M.Y. Summers, F. Kong, X. Feng, M.M. Siegel, J.E. Janso, E.I. Graziani, G.T. Carter, Septocylindrin A and B: peptaibols produced by the terrestrial fungus *Septocylindrium* sp. LL-21518, *J. Nat. Prod.* 70 (2007) 391–396.
- [11] H.N. Su, Z.H. Chen, X.Y. Song, X.L. Chen, M. Shi, B.C. Zhou, X. Zhao, Y.Z. Zhang, Antimicrobial peptide trichokonin VI-induced alterations in the morphological and nanomechanical properties of *Bacillus subtilis*, *PLoS One* 7 (2012) 25.
- [12] P. Pruksakorn, M. Arai, N. Kotoku, C. Vilchèze, A.D. Baughn, P. Moodley, W.R. Jacobs Jr., M. Kobayashi, Trichodermins, novel aminolipopeptides from a marine sponge-derived *Trichoderma* sp., are active against dormant mycobacteria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 3658–3663.
- [13] P. Pruksakorn, M. Arai, L. Liu, P. Moodley, W.R. Jacobs Jr., M. Kobayashi, Action-mechanism of trichodermin A, an anti-dormant mycobacterial aminolipopeptide from marine sponge-derived *Trichoderma* sp. *Biol. Pharm. Bull.* 34 (2011) 1287–1290.
- [14] M. Shi, L. Chen, X.W. Wang, T. Zhang, P.B. Zhao, X.Y. Song, C.Y. Sun, X.L. Chen, B.C. Zhou, Y.Z. Zhang, Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens, *Microbiology* 158 (2012) 166–175.
- [15] A. Viterbo, A. Wiest, Y. Brotman, I. Chet, C. Kenerley, The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses, *Mol. Plant. Pathol.* 8 (2007) 737–746.
- [16] A. Wiest, D. Grzegorski, B.W. Xu, C. Goulard, S. Rebuffat, D.J. Ebbale, B. Bodo, C. Kenerley, Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 20862–20868.
- [17] B.S. Yun, I.D. Yoo, Y.H. Kim, Y.S. Kim, S.J. Lee, K.S. Kim, W.H. Yeo, Peptavirins two new antiviral peptaibols against TMV infection, *Tetrahedron Lett.* 41 (2000) 1429–1431.
- [18] Y.H. Kim, W.H. Yeo, Y.S. Kim, S.Y. Chae, K.S. Kim, Antiviral activity of antibiotic peptaibols, chrysospermins B and D, produced by *Apiocrea* sp. 14T against TMV infection, *J. Microbiol. Biotechnol.* 10 (2000) 522–528.
- [19] Y. Luo, D.D. Zhang, X.W. Dong, P.B. Zhao, L.L. Chen, X.Y. Song, X.J. Wang, X.L. Chen, M. Shi, Y.Z. Zhang, Antimicrobial peptaibols induce defense responses and systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus, *FEMS Microbiol. Lett.* 313 (2010) 120–126.
- [20] M. El Hajji, S. Rebuffat, T. Le Doan, G. Klein, M. Satre, B. Bodo, Interaction of trichorizianines A and B with model membranes and with the amoeba *Dictyostelium*, *BBA-Biomembranes* 978 (1989) 97–104.
- [21] G. Nagaraj, M.V. Uma, M.S. Shivayogi, H. Balaram, Antimalarial activities of peptide antibiotics isolated from fungi, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 145–149.
- [22] T. Degenkolb, T. Gräfenham, A. Berg, H.I. Nirenberg, W. Gams, H. Brückner, Peptaibiotics, Screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species, *Chem. Biodivers.* 3 (2006) 593–610.
- [23] M.S.P. Sansom, Structure and function of channel-forming peptaibols, *Q. Rev. Biophys.* 26 (1993) 365–421.
- [24] M.S. Sansom, The biophysics of peptide models of ion channels, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 55 (1991) 139–235.
- [25] N. Stoppacher, N.K. Neumann, L. Burgstaller, S. Zeilinger, T. Degenkolb, H. Brückner, R. Schuhmacher, The comprehensive peptaibiotics database, *Chem. Biodivers.* 10 (2013) 734–743.
- [26] R. Mikkola, M.A. Andersson, L. Kredics, P.A. Grigoriev, N. Sundell, M.S. Salkinoja-Salonen, 20-residue and 11-residue peptaibols from the fungus *Trichoderma longibrachiatum* are synergistic in forming Na⁺/K⁺– permeable channels and adverse action towards mammalian cells, *FEBS J.* 279 (2012) 4172–4190.
- [27] L. Poirier, J.C. Amiard, F. Mondegue, F. Quiniou, N. Ruiz, Y.F. Pouchus, M. Montagu, Determination of peptaibol trace amounts in marine sediments by liquid chromatography/electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1160 (2007) 106–113.
- [28] T. Degenkolb, R. Dieckmann, K.F. Nielsen, T. Gräfenham, C. Theis, D. Zafari, P. Chaverri, A. Ismaïel, H. Brückner, H. von Döhren, U. Thrane, O. Petri, G.J. Samuels, The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins, *Mycol. Prog.* 7 (2008) 177–219.
- [29] K. Ben Haj Salah, N. Inguibert, Efficient microwave-assisted one shot synthesis of peptaibols using inexpensive coupling reagents, *Org. Lett.* 16 (2014) 1783–1785.
- [30] D. Becker, M. Kiess, H. Brückner, Structure of peptaibol antibiotics hypomurocin A and B from the ascomycetous fungus *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto, *Liebigs Ann. Rec.* (1997) 767–772.
- [31] A. Berg, M. Ritzau, W. Ihn, B. Schlegel, W.F. Fleck, S. Heinze, U. Gräfe, Isolation and structure of bergofungin, a new antifungal peptaibol from *Emicelopsis donezii* HKI 0059, *J. Antibiot.* 49 (1996) 817–820.
- [32] A. Carroux, A.I. Van Bohemen, C. Roullier, T. Robiou du Pont, M. Vansteelandt, A. Bondon, A. Zalouk-Vernoux, Y.F. Pouchus, N. Ruiz, Unprecedented 17-residue peptaibiotics produced by marine-derived *Trichoderma atroviride*, *Chem. Biodivers.* 10 (2013) 772–786.
- [33] F.A.D.A. USDepartment of Health and Human Services, Centre for Drug Evaluation and Research (CDER), Centre for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry, Bionalytical Method Validation Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107>, 2001.
- [34] S. Rebuffat, C. Goulard, B. Bodo, M.F. Roquebert, The peptaibols antibiotics from *Trichoderma* soil fungi: structural diversity and membrane properties, *Recent Res. Dev. Org. Bioorg. Chem.* 3 (1999) 65–91.
- [35] T. Neuhof, R. Dieckmann, I.S. Druzhinina, C.P. Kubicek, H. von Döhren, Intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptaibol formation by the genus *Trichoderma/Hypocrea*: can molecular phylogeny of species predict peptaibol structures? *Microbiology* 153 (2007) 3417–3437.
- [36] T. Degenkolb, R. Karimi Aghcheh, R. Dieckmann, T. Neuhof, S.E. Baker, I.S. Druzhinina, C.P. Kubicek, H. Brückner, H. von Döhren, The production of multiple small peptaibol families by single 14-module peptide synthetases in *Trichoderma/Hypocrea*, *Chem. Biodivers.* 9 (2012) 499–535.
- [37] N.K. Neumann, N. Stoppacher, S. Zeilinger, T. Degenkolb, H. Brückner, R. Schuhmacher, The peptaibiotics database—a comprehensive online resource, *Chem. Biodivers.* 12 (2015) 743–751.
- [38] N. Ruiz, G. Wielgosz-Collin, L. Poirier, O. Grovel, K.E. Petit, M. Mohamed-Benkada, T. Robiou du Pont, J. Bissett, P. Verrité, G. Barnathan, Y.F. Pouchus, New trichobrachins, 11-residue peptaibols from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*, *Peptides* 28 (2007) 1351–1358.
- [39] L. Poirier, F. Quiniou, N. Ruiz, M. Montagu, J.C. Amiard, Y.F. Pouchus, Toxicity assessment of peptaibols and contaminated sediments on *Crassostrea gigas* embryos, *Aquat. Toxicol.* 83 (2007) 254–262.
- [40] N. Ruiz, K.E. Petit, M. Vansteelandt, I. Kerzaon, J. Baudet, Z. Amzil, J.F. Biard, O. Grovel, Y.F. Pouchus, Enhancement of domoic acid neurotoxicity on diptera larvae bioassay by marine fungal metabolites, *Toxicol.* 55 (2010) 805–810.
- [41] H.B. Bode, B. Bethe, R. Hofs, A. Zeeck, Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity, *Chembiochem* 3 (2002) 619–627.
- [42] C. Krause, J. Kirschbaum, H. Brückner, Peptaibiotics: microheterogeneity, dynamics, and sequences of Trichobrachins, peptaibiotics from *Trichoderma parceramosum* Bissett (*T. longibrachiatum* Reisel), *Chem. Biodivers.* 4 (2007) 1083–1102.
- [43] W.M. Jaklitsch, European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores, *Fungal Divers.* 48 (2011) 1–250.
- [44] G.J. Samuels, A. Ismaïel, T.B. Mulaw, G. Szakacs, I.S. Druzhinina, C.P. Kubicek, W.M. Jaklitsch, The *Longibrachiatum* Clade of *Trichoderma*: a revision with new species, *Fungal Divers.* 55 (2012) 77–108.
- [45] L. Béven, O. Helluin, G. Molle, H. Duclouhier, H. Wróblewski, Correlation between anti-bacterial activity and pore sizes of two classes of voltage-dependent channel-forming peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1421 (1999) 53–63.
- [46] I.S. Druzhinina, V. Seidl-Seiboth, A. Herrera-Estrella, B.A. Horwitz, C.M. Kenerley, E. Monte, P.K. Mukherjee, S. Zeilinger, I.V. Grigoriev, C.P. Kubicek, *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success, *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (2011) 749–759.

5. Conclusion du chapitre

La littérature décrit une action antifongique des *Trichoderma* et plus spécifiquement des peptaïbols longs produits par certaines espèces ((Sansom, 1991; Sansom, 1993; Sansom, 1993)). Mais, suivant le pathogène ciblé, toutes les classes de peptaïbols longs n'ont pas la même efficacité. La détermination de la corrélation de l'action biologique sur des agents phytopathogènes des *Trichoderma* avec leur production quantitative de peptaïbols semble intéressante. Pour cela, il est nécessaire de quantifier les peptaïbols dans les extraits de *Trichoderma*. Ceci permettrait à terme un large criblage des souches de *Trichoderma* afin de sélectionner les plus productrices de peptaïbols longs, pouvant être de bons candidats pour une utilisation en tant qu'agent de biocontrôle dans l'agriculture.

La production de peptaïbols varie d'une souche à l'autre, mais une même espèce de *Trichoderma* semble produire les mêmes classes de peptaïbols, avec un même profil massique, mais dans des proportions différentes suivant la souche. De plus, les souches appartenant à un même clade ont également une production de classe de peptaïbols similaires mais avec un profil massique différent.

Suite à des essais réalisés avec différents solvants ou mélanges de solvant d'extraction, deux extractions successives de la biomasse fongique avec un mélange de dichlorométhane et de méthanol ayant des proportions différentes pour chaque extraction, suivi d'un lavage à l'eau ont été réalisées pour les extractions de peptaïbols des biomasses fongiques. Les rendements d'extraction obtenus grâce à ce mélange ont été calculés après dopages en peptaïbols de biomasses fongiques et ce sont révélés assez faibles et plus faibles que ceux déterminés par Poirier *et al.* dans les matrices sédimentaires et de moules (Poirier *et al.*, 2007).

Afin de quantifier la production en peptaïbols des *Trichoderma*, une méthode de dosage des peptaïbols dans les extraits bruts de *Trichoderma* marins a été mise au point et validée. Grâce à cette méthode de dosage, s'appuyant sur une calibration externe et réalisée avec des standards proches des peptaïbols extraits, il a été possible de quantifier la production de chaque souche sélectionnée. En effet, l'étalon choisi pour le dosage des peptaïbols à 11 résidus est un

peptaïbol à 11 résidus (PEP-11), celui choisi pour quantifier les 14 et 15 résidus est un peptaïbol à 14 résidus (PEP-14) et l'alaméthicine sert de standard pour les peptaïbols longs (de 17 à 20 résidus).

Les limites de détection déterminées pour cette méthode sont comprises entre 0,02 et 0,06 µg/mL d'extrait brut pour les 3 étalons. En ce qui concerne les limites de quantification, les valeurs vont de 0,07 µg/mL à 0,22 µg/mL d'extrait brut.

Les effets matrices sont très souvent observés dans le cas de matrices biologiques complexes. Ils sont liés à une diminution de l'ionisation des molécules d'intérêt dans la source, résultant d'une compétition entre les analytes d'intérêt et les impuretés coéluées de la matrice. La comparaison des méthodes de calibration externe (standard en solution méthanolique) et de la méthode des ajouts dosés (standards dans la matrice) n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'un effet matrice pour aucun des standards.

La méthode de dosage des peptaïbols dans les extraits bruts de *Trichoderma* a permis l'étude de la cinétique de production des peptaïbols de la souche MMS 151 (*T. longibrachiatum*). Elle a ainsi permis de déterminer le temps de culture optimal pour l'obtention du maximum de production de peptaïbols (9 jours). La mise au point de cette méthode de dosage a également rendue possible la quantification de la production de peptaïbols par plusieurs souches de *Trichoderma* d'espèces différentes. Les résultats des concentrations de peptaïbols rapportées à la biomasse fongique obtenue suite à l'application de la méthode développée sont en accord avec des résultats déterminés par une autre étude (Mikkola *et al.*, 2012). Ainsi, un premier criblage a pu être réalisé afin de sélectionner les souches les plus productrices des peptaïbols d'intérêt.

En effet, ces souches pourraient s'avérer être pertinentes dans un but d'utilisation en tant qu'agent de biocontrôle. Parmi les souches criblées, trois souches se sont démarquées par leur production en peptaïbols longs :

- MMS 151 pour sa production de peptaïbols à 20 résidus,
- MMS 639 pour sa production de peptaïbols à 19 résidus,
- MMS 1541 pour sa production de peptaïbols à 18 résidus.

La sélection de ces trois souches a uniquement été réalisée en fonction des résultats du criblage des différentes souches et en termes de production de peptaïbols longs. Néanmoins, certaines espèces de *Trichoderma* peuvent causer des infections opportunistes chez des sujets immunodéprimés, comme les *T. longibrachiatum* (Druzhinina *et al.*, 2011) ou produire des mycotoxines, comme cela est le cas des *T. harzianum* (Degenkolb *et al.*, 2008). Même si les infections causées chez l'Homme et les animaux restent rares (Degenkolb *et al.*, 2015), l'utilisation des souches de *Trichoderma* comme agent de biocontrôle doit prendre en compte des données de toxicité.

Une étude métabolomique de la production d'autres métabolites fongiques s'avère être nécessaire pour s'assurer que les souches sélectionnées ne produisent pas de mycotoxine en vue de leur utilisation en tant qu'agent de biocontrôle. Cette étude complémentaire permettra également une meilleure connaissance des autres métabolites responsables de l'activité antagoniste des souches de *Trichoderma* d'origine marine. Cela étant, les peptaïbols purifiés pourraient directement être utilisés en tant qu'agent de biocontrôle. Cette utilisation directe pourrait être un bon moyen de pallier la présence de mycotoxines produites par certaines souches. L'étude de la stabilité de ces composés dans un environnement proche de celui du terrain sera alors nécessaire.

Conclusion générale et perspectives

Le présent travail consistait à étudier l'intérêt des *Trichoderma* d'origine marine et des peptaïbols pour une utilisation en biocontrôle afin de lutter contre les champignons phytopathogènes. Cette recherche participait à une des thématiques principales du laboratoire, l'étude des champignons marins et de leurs métabolites bioactifs.

Au moyen de différentes techniques analytiques employées, telles que la chromatographie liquide ou gazeuse, la spectrométrie de masse, la RMN ou la néphélométrie laser, ensemble d'outils décrits dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons développé des recherches pour répondre à trois objectifs principaux :

- l'identification de nouvelles séries de peptaïbols produits par les souches marines de *Trichoderma*,
- l'intérêt des *Trichoderma* marins et de leurs métabolites pour la lutte contre les phytopathogènes,
- le développement d'une méthode de dosage des peptaïbols dans les cultures de *Trichoderma* marins.

Le premier objectif de cette thèse a été l'identification de nouveaux peptaïbols. En effet, dans le panel de souches de *Trichoderma* étudiées et disponibles au laboratoire, deux se sont avérées être productrices de peptaïbiotiques non décrits dans la littérature.

En recherchant une souche productrice de peptaïbols à 14 résidus, afin de les purifier pour l'étude des propriétés antifongiques, nous avons sélectionné une souche identifiée en premier lieu comme étant un *Trichoderma harzianum* de la mycothèque du laboratoire. Contre toute attente, celle-ci produisait également des peptaïbols atypiques, qui après séquençage se sont révélés posséder 15 résidus ce qui n'avait encore jamais été observé chez des *Trichoderma*. Les analyses spectroscopiques (MS, RMN) et la dérivation par le réactif Marfey des acides aminés composant ces peptaïbols à 15 résidus ont permis d'en déterminer la structure. Une originalité de ces peptaïbols était l'absence de proline dans leur séquence, ce qui était totalement nouveau pour des peptaïbols de *Trichoderma*. L'alignement de leurs séquences avec celles des peptaïbols à longue chaîne des *Trichoderma* a montré une forte homologie avec les peptaïbols à 18 résidus,

habituellement produits par les champignons de l'espèce *T. harzianum*. Une absence de 3 acides aminés a été observée, identique à celle qui différencie les peptaïbols à 11 et 14 résidus. Par analogie, une hypothèse sur le mécanisme de biosynthèse a été émise en s'appuyant sur les travaux réalisés sur ces autres peptides. Cette découverte ouvre des perspectives intéressantes pour la chimiotaxonomie du complexe d'espèces *T. harzianum*, et pour l'approfondissement de la compréhension de leur biosynthèse.

Parallèlement, une souche de *T. atroviride* a été remarquée pour sa production de peptaïbiotiques originaux à 17 résidus présentant un résidu C-terminal non conventionnel. Plusieurs étapes de purification et une analyse par HRMS, ont permis de proposer une formule brute pour ce résidu. Après plusieurs tentatives de détermination de sa structure à l'aide de différentes techniques analytiques et de dérivations chimiques, aucune hypothèse n'a pu être entièrement validée. De nouvelles investigations devront être menées dans le futur pour afin d'expliquer la présence de ces peptaïbiotiques, similaires aux peptaïbols à 19 résidus généralement produits par cette espèce, et de comprendre leur biosynthèse.

Le deuxième objectif de ce travail de thèse a été d'étudier le potentiel de valorisation des *Trichoderma* marins en tant qu'agent de biocontrôle. Sachant que les *Trichoderma* produisent des peptaïbols ayant des activités biologiques nombreuses, la première étape a consisté en une étude de relation longueur/activité antifongique des principales séries de ces peptides vis-à-vis de deux agents phytopathogènes. Cette étude a montré que seuls les peptaïbols à longue chaîne (plus de 17 résidus) avaient un réel intérêt dans ce domaine et que leur activité était différente sur les deux pathogènes. Ceci a permis de proposer la production de peptaïbols longs comme critère de sélection des souches de *Trichoderma* pour une utilisation en biocontrôle. Cela a été vérifié avec une souche de *T. atroviride* marin qui a montré des activités antagonistes en co-culture vis-à-vis des phytopathogènes étudiés. Le peptaïbols n'étant pas les seuls métabolites secondaires bioactifs produits par les *Trichoderma*, il a semblé opportun de réaliser une analyse de la production de métabolites chez la souche de *Trichoderma* étudiée face aux phytopathogènes ciblés par une approche de métabolomique. Le traitement des données

obtenues après 3 jours de co-culture a permis de déterminer la présence d'un nombre important d'ions induits diffusés dans le milieu gélosé. Elle devra se poursuivre pour identifier les métabolites impliqués dans les variations observées induites par l'antagonisme des deux souches en présence.

Le dernier objectif était de développer des outils pertinents afin d'étudier la production de peptaïbols par les souches marines de *Trichoderma*, afin de pouvoir sélectionner les plus prometteuses pour une valorisation comme agent de biocontrôle. Après avoir étudié les séries de peptaïbols détectables dans les extraits bruts de 13 souches de *Trichoderma* afin d'étudier la reproductibilité de leur détection en fonction du spectromètre de masse utilisé, une méthode de dosage LC-MS a été mise au point et validée. Pour cela, 3 standards de peptaïbols ayant une longueur de chaîne différente (11, 14 et 20 résidus) ont été synthétisés afin d'optimiser la quantification des peptaïbols en fonction de leur longueur. Au cours de ces travaux, la production de peptaïbols de longueurs différentes a pu être déterminée pour les souches sélectionnées dans la mycothèque du laboratoire. Des différences sont apparues entre les souches au sein d'une même espèce, indiquant que les souches doivent être criblées de manière individuelle. Un premier tri a permis de mettre en évidence l'intérêt de trois souches pour la production de peptaïbols longs. Ce travail devra être reproduit sur l'ensemble des souches de *Trichoderma* de la mycothèque afin de compléter cette sélection.

En conclusion, ce travail qui a débouché sur la découverte de nouvelles séries de peptaïbols, a démontré l'intérêt de rechercher parmi les *Trichoderma* isolés du milieu marin de futurs agents de biocontrôle, a fourni les outils pour effectuer cette recherche et ouvre de nombreuses perspectives de recherche pour les années à venir.

Références bibliographiques

- Altomare, C., W. A. Norvell, T. Björkman and G. E. Harman (1999). "Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22." Applied and Environmental Microbiology **65**(7): 2926-2933.
- Amiche, M., A. A. Seon, H. Wroblewski and P. Nicolas (2000). "Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family." European Journal of Biochemistry **267**(14): 4583-92.
- Augeven-Bour, I., S. Rebuffat, C. Goulard, Y. Prigent and B. Bodo (1997). "Harzianin HB I, an 11-residue peptaibol from *Trichoderma harzianum*: isolation, sequence, solution synthesis and membrane activity." Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1: 1587-1594.
- Auvin-Guette, C., S. Rebuffat, I. Vuidepot, M. Massias and B. Bodo (1993). "Structural elucidation of trikoningins KA and KB, peptaibols from *Trichoderma koningii*." Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1: 249-255.
- Ayers, S., B. M. Ehrmann, A. F. Adcock, D. J. Kroll, E. J. Carcache de Blanco, Q. Shen, S. M. Swanson, J. O. Falkinham, M. C. Wani, S. M. Mitchell, C. J. Pearce and N. H. Oberlies (2012). "Peptaibols from two unidentified fungi of the order Hypocreales with cytotoxic, antibiotic, and anthelmintic activities." Journal of Peptide Science: n/a-n/a.
- Azarmi, R., Hajieghrari, B., Giglou, A., (2011). "Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake " Afr.J. Biotechnol. **10**(31): 5850-5855.
- Baker, R., Elad, Y., Chet, I., (1984). "The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control." Phytopathology **74**: 1019-1021.
- Baumann, G. and P. Mueller (1974). "A molecular model of membrane excitability." Journal of Supramolecular Structure **2**(5-6): 538-557.
- Benedetti, E., A. Bavoso, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, C. Toniolo and G. M. Bonora (1982). "Peptaibol antibiotics: a study on the helical structure of the 2-9 sequence of emerimicins III and IV." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79**(24): 7951-4.
- Benitez, T., A. M. Rincon, M. C. Limon and A. C. Codon (2004). "Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains." International Microbiology **7**(4): 249-60.
- Berek, I., A. Becker, H. Schroder, A. Hartl, V. Holtt and G. Grecksch (2009). "Ampullosporin A, a peptaibol from *Sepedonium ampullosporum* HKI-0053 with neuroleptic-like activity." Behavioural Brain Research **203**(2): 232-9.
- Berg, A., P. A. Grigoriev, T. Degenkolb, T. Neuhof, A. Härtl, B. Schlegel and U. Gräfe (2003). "Isolation, structure elucidation and biological activities of trichofumins A, B, C and D, new 11 and 13mer peptaibols from *Trichoderma* sp. HKI 0276." Journal of Peptide Science **9**(11-12): 810-816.
- Berg, A., M. Ritzau, W. Ihn, B. Schlegel, W. F. Fleck, S. Heinze and U. Grafe (1996). "Isolation and structure of bergofungin, a new antifungal peptaibol from *Emericellopsis donezkii* HKI 0059." The Journal of Antibiotics **49**(8): 817-20.
- Bertrand, S., A. Azzollini, O. Schumpp, N. Bohni, J. Schrenzel, M. Monod, K. Gindro and J.-L. Wolfender (2014). "Multi-well fungal co-culture for de novo metabolite-induction in time-series studies based on untargeted metabolomics." Molecular BioSystems **10**(9): 2289-2298.

- Bertrand, S., N. Bohni, S. Schnee, O. Schumpp, K. Gindro and J.-L. Wolfender (2014). "Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery." Biotechnology Advances **32**: 1180-1204.
- Béven, L., D. Duval, S. Rebuffat, F. G. Riddell, B. Bodo and H. Wróblewski (1998). "Membrane permeabilisation and antimycoplasmic activity of the 18-residue peptaibols, trichorzins PA." Biochimica et Biophysica Acta **1372**(1): 78-90.
- Béven, L., O. Helluin, G. Molle, H. Duclouhier and H. Wróblewski (1999). "Correlation between anti-bacterial activity and pore sizes of two classes of voltage-dependent channel-forming peptides." Biochimica et Biophysica Acta **1421**(1): 53-63.
- Béven, L. and H. Wróblewski (1997). "Effect of natural amphiphatic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes." Research in Microbiology **148**(2): 163-175.
- Bhushan, R. and H. Brückner (2011). "Use of Marfey's reagent and analogs for chiral amino acid analysis: Assessment and applications to natural products and biological systems." Journal of Chromatography B **879**(29): 3148-3161.
- Biemann, K. (1988). "Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure." Biomedical and Environmental Mass Spectrometry **16**(1-12 SPEC. ISS.): 99-111.
- Billich, A. and R. Zocher (1987). "Enzymatic synthesis of cyclosporin A." Journal of Biological Chemistry **262**(36): 17258-17259.
- Bissett, J. (1991). "A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification." Canadian Journal of Botany **69**: 2357-2372.
- Boheim, G. (1974). "Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes." Journal of Membrane Biology **19**: 277-303.
- Bouakline, A., C. Lacroix, N. Roux, J. P. Gangneux and F. Derouin (2000). "Fungal contamination of food in hematology units." Journal of Clinical Microbiology **38**(11): 4272-3.
- Brito, J. P., M. H. Ramada, M. T. de Magalhaes, L. P. Silva and C. J. Ulhoa (2014). "Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil." Springerplus **3**(600): 2193-1801.
- Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" Nature Reviews Microbiology **3**(3): 238-250.
- Brückner, H. and H. Graf (1983). "Paracelsin, a peptide antibiotic containing α -aminoisobutyric acid, isolated from *Trichoderma reesei* Simmons. Part A." Experientia **39**(5): 528-530.
- Brückner, H., H. Graf and M. Bokel (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**(11): 1189-97.
- Brückner, H., G. Jung and M. Przybylski (1983). "Chromatographic and mass spectrometric characterization of the structures of the polypeptide antibiotics samarospurin and stilbellin and identity with emerimicin." Chromatographia **17**(12): 679-685.
- Brückner, H., T. Kripp and M. Kieb (1991). Sequencing of new Aib-peptides by tandem mass spectrometry and automated Edman degradation. Peptides 1990, Proceedings of the 21th European Peptide Symposium. E. Giralt and D. Andreu. Leiden, The Netherlands, ESCOM Sciences Publishers: 347-350.

- Brückner, H., J. Maisch, C. Reinecke and A. Kimonyo (1991). "Use of alpha-aminoisobutyric acid and isovaline as marker amino acids for the detection of fungal polypeptide antibiotics. Screening of *Hypocrea*." Amino Acids **1**(2): 251-7.
- Brückner, H. and M. Przybylski (1984). "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." Journal of Chromatography A **296**(0): 263-275.
- Brückner, H. and M. Przybylski (1984). "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." Journal of Chromatography A **296**: 263-275.
- Burge, H. A. (1985). "Fungus allergens." Clinical Reviews in Allergy **3**(3): 319-29.
- Cafiso, D. S. (1994). "Alamethicin: a peptide model for voltage gating and protein-membrane interactions." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **23**: 141-165.
- Canal-Raffin, M., B. a. l  Azou, J. Jorly, A. Hurtier, J. Cambar and P. Brochard (2008). "Cytotoxicity of folpet fungicide on human bronchial epithelial cells." Toxicology **249**(2  3): 160-166.
- Carroux, A., A.-I. Van Bohemen, C. Roullier, T. Robiou du Pont, M. Vansteelandt, A. Bondon, A. Zalouk-Vergnoux, Y. F. Pouchus and N. Ruiz (2013). "Unprecedented 17-residue peptaibiotics produced by marine-derived *Trichoderma atroviride*." Chemistry and Biodiversity **10**(5): 772-786.
- cbm.cnrs-orleans.fr. (1999). Retrieved 17/02/2016, from <http://cbm.cnrs-orleans.fr/spip.php?article133>.
- Chaverri, P., F. Branco-Rocha, W. Jaklitsch, R. Gazis, T. Degenkolb and G. J. Samuels (2015). "Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains." Mycologia **107**(3): 558-90.
- Chen, F.-Y., Lee, M.-T., Huang, H.W. (2002). "Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: A case study on alamethicin." Biophysical Journal **82**: 908-914.
- Chen, F., J. C. D'Auria, D. Tholl, J. R. Ross, J. Gershenzon, J. P. Noel and E. Pichersky (2003). "An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense." Plant Journal **36**(5): 577-88.
- Christoffersen, H. F., S. K. Hansen, B. S. Vad, E. H. Nielsen, J. T. Nielsen, T. Vosegaard, T. Skrydstrup and D. E. Otzen (2015). The natural, peptaibolic peptide SPF-5506-A4 adopts a β^2 -bend spiral structure, shows low hemolytic activity and targets membranes through formation of large pores.
- Chugh, J. K., H. Brückner and B. A. Wallace (2002). "Model for a helical bundle channel based on the high-resolution crystal structure of trichotoxin_A50E." Biochemistry **41**(43): 12934-12941.
- Chugh, J. K. and B. A. Wallace (2001). "Peptaibols: Models for ion channels." Biochemical Society Transactions **29**(4): 565-570.
- Colakoglu, G. (2003). "Airborne fungal spores at the Belgrad forest near the city of Istanbul (Turkey) in the year 2001 and their relation to allergic diseases." Journal of Basic Microbiology **43**(5): 376-84.

- Cooke, D. E. L., P. D. Jenkins and D. M. Lewis (1997). "Production of phytotoxic spore germination liquids by *Alternaria brassicae* and *A. brassicicola* and their effect on species of the family *Brassicaceae*." Annals of Applied Biology **131**(3): 413-426.
- Cortes, C., A. Gutierrez, V. Olmedo, J. Inbar, I. Chet and A. Herrera-Estrella (1998). "The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor." Molecular and General Genetics **260**(2-3): 218-25.
- Cosette, P., S. Rebuffat, B. Bodo and G. Molle (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." Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes **1461**(1): 113-122.
- Cramer, R. A. and C. B. Lawrence (2004). "Identification of *Alternaria brassicicola* genes expressed *in planta* during pathogenesis of *Arabidopsis thaliana*." Fungal Genetics and Biology **41**(2): 115-128.
- Creek, D. J., W. B. Dunn, O. Fiehn, J. L. Griffin, R. D. Hall, Z. Lei, R. Mistrik, S. Neumann, E. L. Schymanski and L. W. Sumner (2014). "Metabolite identification: are you sure? And how do your peers gauge your confidence?" Metabolomics **10**(3): 350.
- Daniel, J. F. D. S. and E. Rodrigues Filho (2007). "Peptaibols of *Trichoderma*." Natural Product Reports **24**(5): 1128-1141.
- Das, M. K., S. Raghothama and P. Balaram (1986). "Membrane channel forming polypeptides. Molecular conformation and mitochondrial uncoupling activity of antiameobin, an alpha-aminoisobutyric acid containing peptide." Biochemistry **25**(22): 7110-7.
- Dathe, M., C. Kaduk, E. Tachikawa, M. F. Melzig, H. Wenschuh and M. Bienert (1998). "Proline at position 14 of alamethicin is essential for hemolytic activity, catecholamine secretion from chromaffin cells and enhanced metabolic activity in endothelial cells." Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes **1370**(1): 175-183.
- Degenkolb, T., A. Berg, W. Gams, B. Schlegel and U. Gräfe (2003). "The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions." Journal of Peptide Science **9**(11-12): 666-678.
- Degenkolb, T. and H. Brückner (2008). "Peptaibiomics: towards a myriad of bioactive peptides containing α -dialkylamino acids?" Chemistry and Biodiversity **5**(9): 1817-1843.
- Degenkolb, T., R. Dieckmann, K. F. Nielsen, T. Gräfenhan, C. Theis, D. Zafari, P. Chaverri, A. Ismaiel, H. Brückner, H. von Döhren, U. Thrane, O. Petrini and G. J. Samuels (2008). "The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins." Mycological Progress **7**(3): 177-219.
- Degenkolb, T., K. Fog Nielsen, R. Dieckmann, F. Branco-Rocha, P. Chaverri, G. J. Samuels, U. Thrane, H. von Dohren, A. Vilcinskis and H. Bruckner (2015). "Peptaibol, secondary-metabolite, and hydrophobin pattern of commercial biocontrol agents formulated with species of the *Trichoderma harzianum* complex." Chemistry and Biodiversity **12**(4): 662-84.
- Degenkolb, T., W. Gams and H. Brückner (2008). "Natural cyclopeptaibiotics and related cyclic tetrapeptides: structural diversity and future prospects." Chemistry and Biodiversity **5**(5): 693-706.

- Degenkolb, T., T. Gräfenham, A. Berg, H. I. Nirenberg, W. Gams and H. Brückner (2006). "Peptaibiotics: Screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species." Chemistry and Biodiversity **3**(6): 593-610.
- Degenkolb, T., R. Karimi Aghcheh, R. Dieckmann, T. Neuhoof, S. E. Baker, I. S. Druzhinina, C. P. Kubicek, H. Brückner and H. von Döhren (2012). "The production of multiple small peptaibol families by single 14-module peptide synthetases in *Trichoderma/Hypocrea*." Chemistry and Biodiversity **9**(3): 499-535.
- Degenkolb, T., J. Kirschbaum and H. Brückner (2007). "New sequences, constituents, and producers of peptaibiotics: an updated review." Chemistry and Biodiversity **4**(6): 1052-1067.
- Degenkolb, T., H. von Döhren, K. F. Nielsen, G. J. Samuels and H. Bruckner (2008). "Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*." Chemistry and Biodiversity **5**(5): 671-80.
- Demange, P., A. Bateman, J. K. Macleod, A. Dell and M. A. Abdallah (1990). "Bacterial siderophores: unusual 3,4,5,6-tetrahydropyrimidine-based amino acids in pyoverdins from *Pseudomonas fluorescens*." Tetrahedron Letters **31**(52): 7611-7614.
- Di Blasio, B., V. Pavone, M. Saviano, A. Lombardi, F. Nastri, E. Benedetti, M. Crisma, M. Anzolin and C. Toniolo (1992). "Structural characterization of the β -bend ribbon spiral: crystallographic analysis of two long (L-Pro-Aib)_n sequential peptides." Journal of the American Chemical Society **114**: 6273-6278.
- doping.chuv. Retrieved 17/02/2016, from <http://www.doping.chuv.ch/lad-trappe.jpg>.
- Druzhinina, I. and C. P. Kubicek (2005). "Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?" Journal of Zhejiang University Sciences **6B**(2): 100-12.
- Druzhinina, I. S., M. Komon-Zelazowska, L. Kredics, L. Hatvani, Z. Antal, T. Belayneh and C. P. Kubicek (2008). "Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans." Microbiology **154**(Pt 11): 3447-59.
- Druzhinina, I. S., A. G. Kopchinskiy, M. Komon, J. Bissett, G. Szakacs and C. P. Kubicek (2005). "An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*." Fungal Genetics and Biology **42**(10): 813-28.
- Druzhinina, I. S., A. G. Kopchinskiy and C. P. Kubicek (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. **47**: 55-64.
- Druzhinina, I. S., K. LaFe, B. Willinger, M. Komon-Zelazowska, J. Ammirati, C. p. Kubicek and J. D. Roger (2007). "An unknown *Hypocreaceae* species isolated from human lung tissue of a patient with non-fatal pulmonary fibrosis." Clinical Microbiology Newsletter **29**: 180-184.
- Druzhinina, I. S., V. Seidl-Seiboth, A. Herrera-Estrella, B. A. Horwitz, C. M. Kenerley, E. Monte, P. K. Mukherjee, S. Zeilinger, I. V. Grigoriev and C. P. Kubicek (2011). "*Trichoderma*: the genomics of opportunistic success." Nature Reviews Microbiology **9**(10): 749-59.
- Duclohier, H. (2004). "Helical kink and channel behaviour: a comparative study with the peptaibols alamethicin, trichotoxin and antiamoebin." European Biophysics Journal **33**(3): 169-74.

- Duclohier, H., G. M. Alder, C. L. Bashford, H. Brückner, J. K. Chugh and B. A. Wallace (2004). "Conductance studies on trichotoxin_A50E and implications for channel structure." Biophysical Journal **87**(3): 1705-1710.
- Duclohier, H. and H. Wroblewski (2001). "Voltage-dependent pore formation and antimicrobial activity by alamethicin and analogues." Journal of Membrane Biology **184**(1): 1-12.
- Duval, D., P. Cosette, S. Rebuffat, H. Duclohier, B. Bodo and G. Molle (1998). "Alamethicin-like behaviour of new 18-residue peptaibols, trichorzins PA. Role of the C-terminal amino-alcohol in the ion channel forming activity." Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes **1369**(2): 309-319.
- El Hajji, M., S. Rebuffat, T. Le Doan, G. Klein, M. Satre and B. Bodo (1989). "Interaction of trichorzianines A and B with model membranes and with the amoeba *Dictyostelium*." Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes **978**(1): 97-104.
- El Hajji, M., S. Rebuffat, D. Lecommandeur and B. Bodo (1987). "Isolation and sequence determination of trichorzianines A antifungal peptides from *Trichoderma harzianum*." International Journal of Peptide and Protein Research **29**(2): 207-215.
- El Komy, M. H., A. A. Saleh, A. Eranthodi and Y. Y. Molan "Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* Isolates to Select Effective Biocontrol Agents Against Tomato *Fusarium* Wilt." Plant Pathol J **31**(1): 50-60.
- Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen (2007). *Botrytis spp.* and diseases they cause in agricultural systems - an Introduction. Botrytis: Biology, Pathology and Control, Springer Netherlands: 1-8.
- Engelberth, J., T. Koch, G. Schuler, N. Bachmann, J. Rechtenbach and W. Boland (2001). "Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrill coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean." Plant Physiology **125**(1): 369-77.
- Engelberth, J., Koch, T., Schüler, G., Bachmann, N., Rechtenbach, J., Boland, W., (2001). "Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrill coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. ." Plant Physiology **125**: 369-377.
- Epand, R. M., Y. Shai, J. P. Segrest and G. M. Anantharamaiah (1995). "Mechanisms for the modulation of membrane bilayer properties by amphipathic helical peptides." Biopolymers - Peptide Science Section **37**(5): 319-338.
- Escudero Gil, M. R., E. Pino Corral and R. Munoz Munoz (1976). "[Pulmonary mycoma cause by *Trichoderma viride*]." Actas Dermo-Sifiliograficas **67**(9-10): 673-80.
- Ezzi, M. I. and J. M. Lynch (2005). "Biodegradation of cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp." Enzyme and Microbial Technology **36**(7): 849-854.
- Favilla, M., L. Macchia, A. Gallo and C. Altomare (2006). "Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays." Food and Chemical Toxicology **44**(11): 1922-1931.
- Flemen.J. Retrieved 17/02/2016, from <http://jflemen.iutlan.univ-rennes1.fr/CHIMIE/SPECMAS/specmas3.htm>.
- Fox, R. O. and F. M. Richards (1982). "A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-Å resolution." Nature **300**(5890): 325-330.

- Gal-Hemed, I., L. Atanasova, M. Komon-Zelazowska, I. S. Druzhinina, A. Viterbo and O. Yarden (2011). "Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture." Applied and Environmental Microbiology **77**(15): 5100-5109.
- Galbraith, T. P., R. Harris, P. C. Driscoll and B. A. Wallace (2003). "Solution NMR studies of antiamebin, a membrane channel-forming polypeptide." Biophysical Journal **84**(1): 185-94.
- Gautheret, A., F. Dromer, J. H. Bourhis and A. Andreumont (1995). *Trichoderma pseudokoningii* as a cause of fatal infection in a bone marrow transplant recipient, Clin Infect Dis. 1995 Apr;20(4):1063-4.
- Gómez-Alarcón, G., de la Torre, M.A., (1994). "Mecanismos de corrosión microbiana sobre los materiales pétreos." Microbiologia **10**: 111-120.
- Goulard, C., S. Hlimi, S. Rebuffat and B. Bodo (1995). "Trichorzins HA and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum* I. Fermentation, isolation and biological properties." The Journal of Antibiotics **48**(11): 1248-1253.
- Grigoriev, P. A., B. Schlegel, M. Kronen, A. Berg, A. Hartl and U. Grafe (2003). "Differences in membrane pore formation by peptaibols." Journal of Peptide Science **9**(11-12): 763-768.
- Hageskal, G., A. K. Knutsen, P. Gaustad, G. S. de Hoog and I. Skaar (2006). "Diversity and significance of mold species in Norwegian drinking water." Applied and Environmental Microbiology **72**(12): 7586-93.
- Harman, G. (2000). "Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22.." Plant Disease **84**: 377-393.
- Harman, G. E. (2006). "Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp." Phytopathology **96**(2): 190-4.
- Harman, G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito (2004). "Trichoderma species--opportunistic, avirulent plant symbionts." Nature Reviews Microbiology **2**(1): 43-56.
- Harman, G. E. and C. P. Kubicek (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Enzymes, biological control and commercial applications
London, Taylor & Francis.
- Hatvani, L., Z. Antal, L. Manczinger, A. Szekeres, I. S. Druzhinina, C. P. Kubicek, A. Nagy, E. Nagy, C. Vagvolgyi and L. Kredics (2007). "Green Mold Diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. Are Caused by Related but Phylogenetically Different *Trichoderma* Species." Phytopathology **97**(4): 532-7.
- Hawkrige, A. M. (2014). CHAPTER 1 Practical Considerations and Current Limitations in Quantitative Mass Spectrometry-based Proteomics. Quantitative Proteomics, The Royal Society of Chemistry: 1-25.
- He, K., Ludtke, S.J., Heller, W.T., Huang, H.W. (1996). "Mechanism of alamethicin insertion into lipid bilayers." Biophysical Journal **71**: 2669-2679.
- He, K., Ludtke, S.J., Worcester, D.L., Huang, H.W. (1996). "Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores." Biophysical Journal **70**: 2659-2666.
- Hosotani, N., K. Kumagai, S. Honda, A. Ito, T. Shimatani and I. Saji (2007). "SPF-5506-A₄, a new peptaibol inhibitor of amyloid B-peptide formation produced by *Trichoderma* sp." The Journal of Antibiotics **60**(3): 184-90.

- Hou, C. T., A. Ciegler and C. W. Hesseltine (1972). "New mycotoxin, trichotoxin A, from *Trichoderma viride* isolated from southern leaf blight-infected corn." Applied Microbiology **23**(1): 183-5.
- Huang, H. W. (2000). "Action of antimicrobial peptides: Two-state model." Biochemistry **39**: 8347-8352.
- Hulsmann, H., S. Heinze, M. Ritzau, B. Schlegel and U. Gräfe (1998). "Isolation and structure of peptaibolin, a new peptaibol from *Sepedonium* strains [1]." The Journal of Antibiotics **51**(11): 1055-1058.
- Hur, M., A. A. Campbell, M. Almeida-de-Macedo, L. Li, N. Ransom, A. Jose, M. Crispin, B. J. Nikolau and E. S. Wurtele (2013). "A global approach to analysis and interpretation of metabolic data for plant natural product discovery." Natural Product Reports **30**(4): 565-83.
- Hyvärinen, A., T. Reponen, T. Husman and A. Nevalainen (2001). "Comparison of the indoor air quality in mould damaged and reference buildings in a subarctic climate." Central European Journal of Public Health **9**(3): 133-9.
- Iacomi-Vasilescu, B., H. Avenot, N. Bataillé-Simoneau, E. Laurent, M. Guénard and P. Simoneau (2004). "In vitro fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles." Crop Protection **23**(6): 481-488.
- Iida, A., M. Sanekata, T. Fujita, H. Tanaka, A. Enoki, G. Fuse, M. Kanai, P. J. Rudewicz and E. Tachikawa (1994). "Fungal metabolites. XVI. Structures of new peptaibols, trichokindins I- VII, from the fungus *Trichoderma harzianum*." Chemical and Pharmaceutical Bulletin **42**(5): 1070-1075.
- Iida, A., M. Sanekata, T. Fujita, H. Tanaka, A. Enoki, G. Fuse, M. Kanai, P. J. Rudewicz and E. Tachikawa (1994). "Fungal metabolites. XVI. Structures of new peptaibols, trichokindins I-VII, from the fungus *Trichoderma harzianum*." Chemical and Pharmaceutical Bulletin **42**(5): 1070-5.
- Jaklitsch, W. M. and H. Voglmayr (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. Hypocrealean lineages of industrial and phytopathological importance. **80**: 1-87.
- Jaworski, A. and H. Brückner (1999). "Detection of new sequences of peptaibol antibiotics trichotoxins A-40 by on-line liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry." Journal of Chromatography A **862**(2): 179-189.
- Jiang, J., L. Ding, T. J. Michailides, H. Li and Z. Ma (2009). "Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*." Pesticide Biochemistry and Physiology **93**(2): 72-76.
- Jokanovic, M. and M. Kosanovic (2010). "Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides." Environmental Toxicology and Pharmacology **29**(3): 195-201.
- Joubert, A., B. Calmes, R. Berruyer, M. Pihet, J.-P. Bouchara, P. Simoneau and T. Guillemette (2010). "Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth." BioTechniques **48**(5): 399-404.
- Kadar, H. (2011). Contribution à l'évaluation de l'exposition et de l'imprégnation de l'homme aux contaminants émergents de type perfluorés.

- Kebarle, P. and U. H. Verkerk (2009). "Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now." Mass Spectrometry Reviews **28**(6): 898-917.
- Kim, Y. H., W. H. Yeo, Y. S. Kim, S. Y. Chae and K. S. Kim (2000). "Antiviral activity of antibiotic peptaibols, chrysospermins B and D, produced by *Apiocrea* sp. 14T against TMV infection." Journal of Microbiology and Biotechnology **10**(4): 522-528.
- Kimonyo, A. and H. Brückner (2013). "Sequences of metanicins, 20-residue peptaibols from the ascomycetous fungus CBS 597.80." Chemistry and Biodiversity **10**(5): 813-26.
- Kind, T. and O. Fiehn (2007). "Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry." BMC Bioinformatics **8**: 105.
- Kirschbaum, J., C. Krause, R. K. Winzheimer and H. Brückner (2003). "Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled." Journal of Peptide Science **9**(11-12): 799-809.
- Kleinkauf, H. and H. Von Döhren (1990). "Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics." European Journal of Biochemistry **192**(1): 1-15.
- Krause, C., J. Kirschbaum and H. Brückner (2006). "Peptaibiomics: An advanced, rapid and selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS." Amino Acids **30**(4): 435-443.
- Krause, C., J. Kirschbaum and H. Brückner (2007). "Peptaibiomics: microheterogeneity, dynamics, and sequences of Trichobrachsins, peptaibiotics from *Trichoderma parceramosum* Bissett (*T. longibrachiatum* Rifai)." Chemistry and Biodiversity **4**(6): 1083-1102.
- Kredics, L., V. Narendran, C. S. Shobana, C. Vagvolgyi and P. Manikandan (2015). "Filamentous fungal infections of the cornea: a global overview of epidemiology and drug sensitivity." Mycoses **58**(4): 243-60.
- Kredics, L., A. Szekeres, D. Czifra, C. Vagvolgyi and B. Leitgeb (2013). "Recent results in alamethicin research." Chemistry and Biodiversity **10**(5): 744-71.
- Kropacheva, T. N., E. S. Salnikov, H. H. Nguyen, S. Reissmann, Z. A. Yakimenko, A. A. Tagaev, T. V. Ovchinnikova and J. Raap (2005). "Membrane association and activity of 15/16-membered peptide antibiotics: Zervamicin IIB, ampullosporin A and anti amoebic I." Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes **1715**(1): 6-18.
- Kubicek, C. P., J. Bissett, I. Druzhinina, C. Kullnig-Gradinger and G. Szakacs (2003). "Genetic and metabolic diversity of Trichoderma: a case study on South-East Asian isolates." Fungal Genetics and Biology **38**(3): 310-319.
- Kubicek, C. P., M. Komon-Zelazowska and I. S. Druzhinina (2008). "Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity." Journal of Zhejiang University: Science B **9**(10): 753-763.
- Kubicek, C. P., M. Mikus, A. Schuster, M. Schmoll and B. Seiboth (2009). "Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*." Biotechnol Biofuels **2**(19): 1754-6834.
- Kumar, R., S. Singh and O. V. Singh (2008). "Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **35**(5): 377-91.
- Kurahashi, K., S. Komura, K. Akashi and C. Nishio (1982). Biosynthesis of antibiotic peptides polymyxin E and gramicidin A. Peptide Antibiotics: Biosynthesis and Functions. H. Kieinkauf and H. von Döhren. Berlin, W. de Gruyter: 275-288.

- Landreau, A. (2001). Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii* Oudemans isolée du milieu marin : étude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture, Université de Nantes: 201.
- Landreau, A., Y. F. Pouchus, C. Sallenave-Namont, J. F. Biard, M. C. Boumard, T. Robiou du Pont, F. Mondeguer, C. Goulard and J. F. Verbist (2002). "Combined use of LC/MS and a biological test for rapid identification of marine mycotoxins produced by *Trichoderma koningii*." Journal of Microbiological Methods **48**(2-3): 181-194.
- Le Doan, T., M. El Hajji, S. Rebuffat, M. R. Rajesvari and B. Bodo (1986). "Fluorescence studies of the interaction of trichorzianine A IIIc with model membranes." Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes **858**(1): 1-5.
- Leitgeb, B., A. Szekeres, L. Manczinger, C. Vágvolgyi and L. Kredics (2007). "The history of alamethicin: a review of the most extensively studied peptaibol." Chemistry and Biodiversity **4**(6): 1027-1051.
- Liu, D., H. Lin, P. Proksch, X. Tang, Z. Shao and W. Lin (2015). "Microbacterins A and B, new peptaibols from the deep sea actinomycete *Microbacterium sediminis* sp. nov. YLB-01(T)." Organic Letter **17**(5): 1220-3.
- Lopes, F. A., A. S. Steindorff, A. M. Geraldine, R. S. Brandao, V. N. Monteiro, M. Lobo, Jr., A. S. Coelho, C. J. Ulhoa and R. N. Silva (2012). "Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*." Fungal Biol **116**(7): 815-24.
- Lopez-Bucio, J., R. Pelagio-Flores and A. Herrera-Estrella (2015). *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus.
- Lorito, M., V. Farkas, S. Rebuffat, B. Bodo and C. P. Kubicek (1996). "Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*." Journal of Bacteriology **178**(21): 6382-5.
- Lorito, M., S. L. Woo, G. E. Harman and E. Monte (2010). "Translational Research on *Trichoderma*: From 'Omics to the Field." Annual Review of Phytopathology **48**(1): 395-417.
- Lorito, M., S. L. Woo, G. E. Harman and E. Monte (2010). "Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field." Annu Rev Phytopathol **48**: 395-417.
- Lucaciu, M., S. Rebuffat, C. Goulard, H. Duclouhier, G. Molle and B. Bodo (1997). "Interaction of the 14-residue peptaibols, harzianins HC, with lipid bilayers: permeability modifications and conductance properties." Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes **1323**(1): 85-96.
- Luo, Y., D. D. Zhang, X. W. Dong, P. B. Zhao, L. L. Chen, X. Y. Song, X. J. Wang, X. L. Chen, M. Shi and Y. Z. Zhang (2010). "Antimicrobial peptaibols induce defense responses and systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus." FEMS Microbiology Letters **313**(2): 120-126.
- Mach, R. L., C. K. Peterbauer, K. Payer, S. Jaksits, S. L. Woo, S. Zeilinger, C. M. Kullnig, M. Lorito and C. P. Kubicek (1999). "Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (T. harzianum P1) is triggered by different regulatory signals." Applied and Environmental Microbiology **65**(5): 1858-63.
- Maddau, L., A. Cabras, A. Franceschini, T. Linaldeddu B, S. Crobu, T. Roggio and D. Pagnozzi (2009). "Occurrence and characterization of peptaibols from *Trichoderma citrinoviride*,

- an endophytic fungus of cork oak, using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry." Microbiology **155**: 3371-3381.
- Malmierca, M. G., R. E. Cardoza, N. J. Alexander, S. P. McCormick, R. Hermosa, E. Monte and S. Gutierrez (2012). "Involvement of *Trichoderma* trichothecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes." Applied and Environmental Microbiology **78**(14): 4856-68.
- Marahiel, M. A., T. Stachelhaus and H. D. Mootz (1997). "Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis." Chemical Reviews **97**: 2651-2673.
- Marsh, D., M. Jost, C. Peggion and C. Toniolo (2007). "Lipid chain-length dependence for incorporation of alamethicin in membranes: electron paramagnetic resonance studies on TOAC-spin labeled analogs." Biophysical Journal **92**(11): 4002-11.
- Martenies, S. E. and M. J. Perry (2013). "Environmental and occupational pesticide exposure and human sperm parameters: A systematic review." Toxicology **307**(0): 66-73.
- Mastouri, F., T. Bjorkman and G. E. Harman (2010). "Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings." Phytopathology **100**(11): 1213-21.
- Masunaka, A., Hyakumachi, M., Takenaka, S., (2011). "Plant growth promoting fungus, *Trichoderma koningii* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicus*." Microbes Environ. **26**: 128-134.
- Matha, V., A. Jegorov, M. Kiess and H. Brückner (1992). "Morphological alterations accompanying the effect of peptaibiotics, α -aminoisobutyric acid-rich secondary metabolites of filamentous fungi, on *Culex pipiens* larvae." Tissue and Cell **24**(4): 559-564.
- Matsuzaki, K., O. Murase, N. Fujii and K. Miyajima (1996). "An Antimicrobial Peptide, Magainin 2, Induced Rapid Flip-Flop of Phospholipids Coupled with Pore Formation and Peptide Translocation." Biochemistry **35**(35): 11361-11368.
- Meyer, C. E. and F. Reusser (1967). "A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*." Experientia **23**(2): 85-6.
- Mikkola, R., M. A. Andersson, L. Kredics, P. A. Grigoriev, N. Sundell and M. S. Salkinoja-Salonen (2012). "20-residue and 11-residue peptaibols from the fungus *Trichoderma longibrachiatum* are synergistic in forming Na⁺/K⁺-permeable channels and adverse action towards mammalian cells." Federation of European Biochemical societies Journal **279**(22): 4172-4190.
- Mitova, M. I., A. C. Murphy, G. Lang, J. W. Blunt, A. L. Cole, G. Ellis and M. H. Munro (2008). "Evolving trends in the dereplication of natural product extracts. 2. The isolation of chrysaibol, an antibiotic peptaibol from a New Zealand sample of the mycoparasitic fungus *Sepedonium chrysospermum*." Journal of Natural Products **71**(9): 1600-3.
- Mohamed-Benkada, M. (2006). Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*, Université de Nantes: 139.
- Mohamed-Benkada, M., M. Montagu, J. F. Biard, F. Mondegue, P. Vérité, M. Dalgalarondo, J. Bissett and Y. F. Pouchus (2006). "New short peptaibols from a marine *Trichoderma* strain." Rapid Communications in Mass Spectrometry **20**(8): 1176-1180.

- Monfil, V. O. and S. Casas-Flores (2014). Chapter 32 - Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and Their Applications in Agriculture. Biotechnology and Biology of Trichoderma. V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella et al. Amsterdam, Elsevier: 429-453.
- Mukherjee, P. K., B. A. Horwitz and C. M. Kenerley (2012). "Secondary metabolism in *Trichoderma* - a genomic perspective." Microbiology **158**(Pt 1): 35-45.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mala Mukherjee, Schmoll, M., Ed. (2013). Trichoderma: Biology and applications. Central Institute for Cotton Research, Shankar, Nagpur 440 010, India.
- Mukherjee, P. K., A. Wiest, N. Ruiz, A. Keightley, M. E. Moran-Diez, K. McCluskey, Y. F. Pouchus and C. M. Kenerley (2011). "Two classes of new peptaibols are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*." Journal of Biological Chemistry **286**: 4544-4554.
- Neuhof, T., R. Dieckmann, I. S. Druzhinina, C. P. Kubicek and H. von Dohren (2007). "Intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptaibol formation by the genus *Trichoderma/Hypocrea*: can molecular phylogeny of species predict peptaibol structures?" Microbiology **153**(Pt 10): 3417-37.
- Neumann, N. K., N. Stoppacher, S. Zeilinger, T. Degenkolb, H. Bruckner and R. Schuhmacher (2015). "The peptaibiotics database - a comprehensive online resource." Chemistry and Biodiversity **12**(5): 743-51.
- O'Reilly, A. O., Wallace, B.A. (2003). "The peptaibol antiameobin as a model ion channel: similarities to bacterial potassium channels." Journal of Peptide Science **9**: 769-775.
- Oh, S. U., S. J. Lee, J. H. Kim and I. D. Yoo (2000). "Structural elucidation of new antibiotic peptides, atroviridins A, B and C from *Trichoderma atroviride*." Tetrahedron Letters **41**(1): 61-64.
- Oh, S. U., B. S. Yun, S. J. Lee, J. H. Kim and I. D. Yoo (2002). "Atroviridins A-C and neoatroviridins A-D, novel peptaibol antibiotics produced by *Trichoderma atroviride* F80317. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities." The Journal of Antibiotics **55**(6): 557-64.
- Oh, S. U., B. S. Yun, S. J. Lee and I. D. Yoo (2005). "Structures and biological activities of novel antibiotic peptaibols neoatroviridins A-D from *Trichoderma atroviride* F80317." Journal of Microbiology and Biotechnology **15**(2): 384-387.
- Oliynyk, V., Kaatz, U., Heimburg, T. (2007). "Defect formation of lytic peptides in lipid membranes and their influence on the thermodynamic properties of pore environment." Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes **1768**: 236-245.
- Olmedo-Monfil, V., A. Mendoza-Mendoza, I. Gomez, C. Cortes and A. Herrera-Estrella (2002). "Multiple environmental signals determine the transcriptional activation of the mycoparasitism related gene *prb1* in *Trichoderma atroviride*." Mol Genet Genomics **267**(6): 703-12.
- Ovchinnikova, T. V., N. G. Levitskaya, O. G. Voskresenskaya, Z. A. Yakimenko, A. A. Tagaev, A. Y. Ovchinnikova, A. N. Murashev and A. A. Kamenskii (2007). "Neuroleptic properties of the ion-channel-forming peptaibol zervamicin: locomotor activity and behavioral effects." Chemistry and Biodiversity **4**(6): 1374-87.

- Pandey, R. C., J. C. Cook, Jr. and K. L. Rinehart, Jr. (1977). "High resolution and field desorption mass spectrometry studied and revised structures of Alamethicins I and II. In : Revised structures of Alamethicins I and II." Journal of the American Chemical Society **99**: 8469-8483.
- Panizel, I., O. Yarden, M. Ilan and S. Carmeli (2013). "Eight New Peptaibols from Sponge-Associated *Trichoderma atroviride*." Marine Drugs **11**(12): 4937.
- Papavizas, G. C. (1985). "Trichoderma and Gliocladium: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol." Annual Review of Phytopathology **23**(1): 23-54.
- Paul, W., H. P. Reinhard and U. Zahn (1958). "Das elektrische Massenfilter als Massenspektrometer und Isotopentrenner." Zeitschrift für Physik **152**(2): 143-182.
- Paz, Z., M. Komon-Zelazowska, I. Druzhinina, M. Aveskamp, A. Shnaiderman, Y. Aluma, S. Carmeli, M. Ilan and O. Yarden (2010). "Diversity and potential antifungal properties of fungi associated with a Mediterranean sponge." Fungal Diversity **42**(1): 17-26.
- Peltola, J., A. Ritieni, R. Mikkola, P. A. Grigoriev, G. Pocsfalvi, M. A. Andersson and M. S. Salkinoja-Salonen (2004). "Biological effects of *Trichoderma harzianum* peptaibols on mammalian cells." Applied and Environmental Microbiology **70**(8): 4996-5004.
- Persoon, C. (1794). "Disposita methodica fungorum." Römer's Neues Mag Bot **1**: 81-128.
- Pluskal, T., S. Castillo, A. Villar-Briones and M. Orešič (2010). "MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data." BMC Bioinformatics **11**(1): 1-11.
- Pluskal, T., T. Uehara and M. Yanagida (2012). "Highly accurate chemical formula prediction tool utilizing high-resolution mass spectra, MS/MS fragmentation, heuristic rules, and isotope pattern matching." Analytical Chemistry **84**(10): 4396-403.
- Poirier, L. (2007). Les peptaïbols, métabolites fongiques toxiques en milieu marin : détection, quantification et implication pour la qualité de l'environnement et la salubrité des coquillages: 1 vol. (xii-158 p.).
- Poirier, L., J. C. Amiard, F. Mondeguer, F. Quiniou, N. Ruiz, Y. F. Pouchus and M. Montagu (2007). "Determination of peptaibol trace amounts in marine sediments by liquid chromatography/electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1160**(1-2): 106-113.
- Poirier, L., M. Montagu, A. Landreau, M. Mohamed-Benkada, O. Grovel, C. Sallenave-Namont, J. F. Biard, C. Amiard-Triquet, J. C. Amiard and Y. F. Pouchus (2007). "Peptaibols, stable markers of fungal development in the marine environment." Chemistry and Biodiversity **4**(6): 1116-1128.
- Poirier, L., F. Quiniou, N. Ruiz, M. Montagu, J. C. Amiard and Y. F. Pouchus (2007). "Toxicity assessment of Peptaïbols and contaminated sediments on *Crassostrea gigas* embryos." Aquatic Toxicology **83**: 254-262.
- Pouny, Y., D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas and Y. Shai (1992). "Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes." Biochemistry **31**(49): 12416-12423.
- Pozo, M. J., Van Loon, L.C., Pieterse, J.M.C., (2005). "Jasmonates-signals in plant-microbe interactions." J. Plant Growth Regul. **23**: 211-222.

- Psurek, A., C. Neusüb, T. Degenkolb, H. Brückner, E. Balaguer, D. Imhof and G. K. E. Scriba (2006). "Detection of new amino acid sequences of alamethicins F30 by nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry." Journal of Peptide Science **12**(4): 279-290.
- Quansah, R., M. S. Jaakkola, T. T. Hugg, S. A. M. Heikkinen and J. J. K. Jaakkola "Residential Dampness and Molds and the Risk of Developing Asthma: A Systematic Review and Meta-Analysis." PLoS One **7**(11): e47526.
- Rebuffat, S., L. Conraux, M. Massias, C. Auvin-Guette and B. Bodo (1993). "Sequence and solution conformation of the 20-residue peptaibols, saturnisporins SA II and SA IV." International Journal of Peptide Protein Research **41**(1): 74-84.
- Rebuffat, S., H. Duclohier, C. Auvin-Guette, G. Molle, G. Spach and B. Bodo (1992). "Membrane-modifying properties of the pore-forming peptaibols saturnisporin SA IV and harzianin HA V." FEMS Microbiology Letters **105**(1-3): 151-160.
- Rebuffat, S., M. El Hajji, P. Hennig, D. Davoust and B. Bodo (1989). "Isolation, sequence, and conformation of seven trichorzianines B from *Trichoderma harzianum*." International Journal of Peptide Protein Research **34**(3): 200-10.
- Rebuffat, S., C. Goulard and B. Bodo (1995). "Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum* Harzianins HC, proline-rich 14-residue peptaibols." Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1: 1849-1855.
- Rebuffat, S., C. Goulard, B. Bodo and M.-F. Roquebert (1999). "The peptaibols antibiotics from *Trichoderma* soil fungi: structural diversity and membrane properties." Recent Research Developments in Organic and Bioorganic Chemistry **3**: 65-91.
- Rebuffat, S., C. Goulard, S. Hlimi and B. Bodo (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*." Journal of Peptide Science **6**(10): 519-33.
- Reiber, K., T. Neuhofer, J. H. Ozegowski, H. Von Döhren and T. Schwecke (2003). "A nonribosomal peptide synthetase involved in the biosynthesis of Ampullosporins in *Sepedonium ampullosporum*." Journal of Peptide Science **9**: 701-713.
- Reithner, B., K. Brunner, R. Schuhmacher, I. Peissl, V. Seidl, R. Krska and S. Zeilinger (2005). "The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites." Fungal Genetics and Biology **42**(9): 749-60.
- Ren, J., C. Xue, L. Tian, M. Xu, J. Chen, Z. Deng, P. Proksch and W. Lin (2009). "Asperelines A-F, peptaibols from the marine-derived fungus *Trichoderma asperellum*." Journal of Natural Products **72**(6): 1036-1044.
- Roepstorff, P. and J. Fohlman (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, Biomed Mass Spectrom. 1984 Nov;11(11):601.
- Rohrich, C. R., A. Iversen, W. M. Jaklitsch, H. Voglmayr, A. Vilcinskas, K. F. Nielsen, U. Thrane, H. von Döhren, H. Bruckner and T. Degenkolb (2013). "Screening the biosphere: the fungicolous fungus *Trichoderma phellincola*, a prolific source of hypophellins, new 17-, 18-, 19-, and 20-residue peptaibiotics." Chemistry and Biodiversity **10**(5): 787-812.
- Rudresh, D. L., M. K. Shivaprakash and R. D. Prasad (2005). "Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.)." Canadian Journal of Microbiology **51**(3): 217-22.

- Ruiz, N. (2007). Micromycètes et métabolites fongiques en milieu marin - Production, identification et évaluation pharmacologique de lipides, acides gras et peptides, Université de Nantes: 283.
- Ruiz, N., N. Dubois, G. Wielgosz-Collin, T. Robiou du Pont, J. P. Bergé, Y. F. Pouchus and G. Barnathan (2007). "Lipid content and fatty acid composition of a marine-derived *Trichoderma longibrachiatum* strain cultured by agar surface and submerged fermentations." Process Biochemistry **42**: 676-680.
- Ruiz, N., K. E. Petit, M. Vansteelandt, I. Kerzaon, J. Baudet, Z. Amzil, J. F. Biard, O. Grovel and Y. F. Pouchus (2010). "Enhancement of domoic acid neurotoxicity on diptera larvae bioassay by marine fungal metabolites." Toxicon **55**: 805-810.
- Ruiz, N., T. Robiou du Pont, Y. Joubert, L. Poirier, A. Vergnoux, O. Grovel, J. Bissett and Y. F. Pouchus (2010). Chemotaxonomic relevance of peptaibol fingerprints for the identification of marine-derived *Trichoderma* strains. 13th International Symposium on Marine Natural Products, October 17-22 2010, Phuket, Thailand.
- Ruiz, N., G. Wielgosz-Collin, L. Poirier, O. Grovel, K. E. Petit, M. Mohamed-Benkada, T. Robiou du Pont, J. Bissett, P. Vérité, G. Barnathan and Y. F. Pouchus (2007). "New trichobrachins, 11-residue peptaibols from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*." Peptides **28**(7): 1351-1358.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turra, D., Woo, S.L., Lorito, M., (2009). "Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant pathogenic fungi." Mol. Plant-Microbe Interact **22**: 291-301.
- Sabareesh, V. and P. Balaram (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 Communications in Mass Spectrometry **20**: 618-628.
- Salas-Marina, M. A., Silva-Flores, M.A., Uresti-Rivera, E.E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A., Casas-Flores, S., (2011). "Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways." Eur. J. Plant Pathol. **131**: 15-26.
- Sallenave-Namont, C., Y. F. Pouchus, T. Robiou du Pont, P. Lassus and J. F. Verbist (2000). "Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas." Mycopathologia **149**(1): 21-25.
- Sallenave, C., Y. F. Pouchus, M. Bardouil, P. Lassus, M. F. Roquebert and J. F. Verbist (1999). "Bioaccumulation of mycotoxins by shellfish: Contamination of mussels by metabolites of a *Trichoderma koningii* strain isolated in the marine environment." Toxicon **37**(1): 77-83.
- Sandgren, M., J. Ståhlberg and C. Mitchinson (2005). "Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes." Progress in Biophysics and Molecular Biology **89**(3): 246-291.
- Sandoval-Denis, M., D. A. Sutton, J. F. Cano-Lira, J. Gene, A. W. Fothergill, N. P. Wiederhold and J. Guarro (2014). "Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities." Journal of Clinical Microbiology **52**(6): 2112-25.

- Sansom, M. S. (1991). "The biophysics of peptide models of ion channels." Progress in Biophysics and Molecular Biology **55**(3): 139-235.
- Sansom, M. S. P. (1993). "Alamethicin and related peptaibols - model ion channels." European Biophysics Journal **22**(2): 105-124.
- Sansom, M. S. P. (1993). "Structure and function of channel-forming peptaibols." Quarterly Reviews of Biophysics **26**(4): 365-421.
- Saravanakumar, K., V. Shanmuga Arasu and K. Kathiresan (2013). "Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*." Aquatic Botany **104**: 101-105.
- Saravanakumar, K., C. Yu, K. Dou, M. Wang, Y. Li and J. Chen (2016). Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. **94**: 37-46.
- Schirmbock, M., M. Lorito, Y. L. Wang, C. K. Hayes, I. Arisan-Atac, F. Scala, G. E. Harman and C. P. Kubicek (1994). "Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi." Applied and Environmental Microbiology **60**(12): 4364-4370.
- Schuster, A. and M. Schmoll (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*, Appl Microbiol Biotechnol. 2010 Jul;87(3):787-99. Epub 2010 May 12 doi:10.1007/s00253-010-2632-1.
- Segarra, G., E. Casanova, M. Aviles and I. Trillas (2010). "*Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron." Microbial Ecology **59**(1): 141-9.
- Seguin, P., B. Degeilh, I. Grulois, A. Gacouin, S. Maugendre, T. Dufour, B. Dupont and C. Camus (1995). "Successful treatment of a brain abscess due to *Trichoderma longibrachiatum* after surgical resection." European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases **14**(5): 445-8.
- Shenkarev, Z. O., A. S. Paramonov, E. N. Lyukmanova, A. K. Gizatullina, A. V. Zhuravleva, A. A. Tagaev, Z. A. Yakimenko, I. N. Telezhinskaya, M. P. Kirpichnikov, T. V. Ovchinnikova and A. S. Arseniev (2013). "Peptaibol antiamoebin I: spatial structure, backbone dynamics, interaction with bicelles and lipid-protein nanodiscs, and pore formation in context of barrel-stave model." Chemistry and Biodiversity **10**(5): 838-63.
- Shi, M., L. Chen, X. W. Wang, T. Zhang, P. B. Zhao, X. Y. Song, C. Y. Sun, X. L. Chen, B. C. Zhou and Y. Z. Zhang (2012). "Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens." Microbiology **158**(Pt 1): 166-75.
- Shi, M., H. N. Wang, S. T. Xie, Y. Luo, C. Y. Sun, X. L. Chen and Y. Z. Zhang (2010). "Antimicrobial peptaibols, novel suppressors of tumor cells, targeted calcium-mediated apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells." Molecular Cancer **9**(1): 26.
- Shoresh, M., G. E. Harman and F. Mastouri (2010). "Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents." Annu Rev Phytopathol **48**: 21-43.
- Sigareva, M. A. and E. D. Earle (1999). "Camalexin induction in intertribal somatic hybrids between *Camelina sativa* and rapid-cycling *Brassica oleracea*." Theoretical and Applied Genetics **98**(1): 164-170.

- Singh H.B., S. B. N., Singh S.P., Sarma B.K. (2012). Exploring different avenues of *Trichoderma* as a potent bio-fungicidal and plant growth promoting candidate-an overview. Jodhpur, India, Scientific publishers.
- Singh, P., C. Raghukumar, P. Verma and Y. Shouche (2010). "Fungal community analysis in the deep-sea sediments of the central Indian Basin by culture-independent approach." Microbial Ecology **2011**: 510-517.
- Sivasithamparam, K., and Ghisalberti, E. L., Ed. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. in: *Trichoderma and Gliocladium*. London.
- Stelzmueller, I., C. Lass-Floerl, C. Geltner, I. Graziadei, S. Schneeberger, H. Antretter, L. Mueller, B. Zelger, N. Singh, T. L. Pruett, R. Margreiter and H. Bonatti (2008). "Zygomycosis and other rare filamentous fungal infections in solid organ transplant recipients." Transplant International **21**(6): 534-46.
- Steyaert, J. M., A. Stewart, M. V. Jaspers, M. Carpenter and H. J. Ridgway (2004). "Co-expression of two genes, a chitinase (chit42) and proteinase (prb1), implicated in mycoparasitism by *Trichoderma hamatum*." Mycologia **96**(6): 1245-52.
- Stoppacher, N., B. Kluger, S. Zeilinger, R. Krska and R. Schuhmacher (2010). "Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS." Journal of Microbiological Methods **81**(2): 187-93.
- Stoppacher, N., N. K. Neumann, L. Burgstaller, S. Zeilinger, T. Degenkolb, H. Bruckner and R. Schuhmacher (2013). "The Comprehensive Peptaibiotics Database." Chemistry and Biodiversity **10**(5): 734-43.
- Stoppacher, N., B. Reithner, M. Omann, S. Zeilinger, R. Krska and R. Schuhmacher (2007). "Profiling of trichorzianines in culture samples of *Trichoderma atroviride* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **21**(24): 3963-3970.
- Stoppacher, N., S. Zeilinger, M. Omann, P. G. Lassahn, A. Roitinger, R. Krska and R. Schuhmacher (2008). "Characterisation of the peptaibiome of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **22**(12): 1889-98.
- Suarez, B., M. Rey, P. Castillo, E. Monte and A. Llobell (2004). "Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity." Applied Microbiology and Biotechnology **65**(1): 46-55.
- Szekeres, A., B. Leitgeb, L. Kredics, Z. Antal, L. Hatvani, L. Manczinger and C. Vagvolgyi (2005). "Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. A review." Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica **52**(2): 137-68.
- Takaishi, Y., H. Terada and T. Fujita (1980). "The effect of two new peptide antibiotics, the hypelcins, on mitochondrial function." Experientia **36**(5): 550-552.
- Thirumalachar, M. J. (1968). "Antiamoebin, a new antiprotozoal-anthelmintic antibiotic. I. Production and biological studies." Hindustan Antibiotics Bulletin **10**(4): 287-9.
- Tijerino, A., R. Elena Cardoza, J. Moraga, M. n. G. Malmierca, F. Vicente, J. Aleu, I. G. Collado, S. Gutiérrez, E. Monte and R. Hermosa (2011). "Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*." Fungal Genetics and Biology **48**(3): 285-296.

- Toniolo, C., G. M. Bonora, A. Bavoso, E. Benedetti, B. di Blasio, V. Pavone and C. Pedone (1983). "Preferred conformations of peptides containing α,α -disubstituted α -amino acids." Biopolymers **22**(1): 205-215.
- Tseng, S. C., S. Y. Liu, H. H. Yang, C. T. Lo and K. C. Peng (2008). "Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(16): 6914-22.
- Vargas, W. A., F. K. Crutcher and C. M. Kenerley (2011). "Functional characterization of a plant-like sucrose transporter from the beneficial fungus *Trichoderma virens*. Regulation of the symbiotic association with plants by sucrose metabolism inside the fungal cells." New Phytologist **189**(3): 777-89.
- Vargas, W. A., J. C. Mandawe and C. M. Kenerley (2009). "Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants." Plant Physiology **151**(2): 792-808.
- Verma, M., S. K. Brar, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli and J. R. ValÃ©ro (2007). "Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control." Biochemical Engineering Journal **37**(1): 1-20.
- Vesper, S. J., C. McKinstry, R. A. Haugland, Y. Iossifova, G. Lemasters, L. Levin, G. K. Khurana Hershey, M. Villareal, D. I. Bernstein, J. Lockey and T. Reponen (2007). "Relative moldiness index as predictor of childhood respiratory illness." Journal of exposure science & environmental epidemiology **17**(1): 88-94.
- Vinale, F., K. Sivasithamparam, E. L. Ghisalberti, R. Marra, M. J. Barbetti, H. Li, S. L. Woo and M. Lorito (2008). "A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants." Physiological and Molecular Plant Pathology **72**(1â€³3): 80-86.
- Viterbo, A., A. Wiest, Y. Brotman, I. Chet and C. Kenerley (2007). "The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses." Molecular Plant Pathology **8**(6): 737-746.
- vitkova, V., mÃ©lÃ©ard, P., Pott, T., Bivas, I. (2006). "Alamethicin influence on the membrane bending elasticity." European Biophysics Journal **35**: 281-286.
- VizcaÃ±o, J. A., R. E. Cardoza, L. Dubost, B. Bodo, S. GutiÃ©rrez and E. Monte (2006). "Detection of peptaibols and partial cloning of a putative peptaibol synthetase gene from *T. harzianum* CECT 2413." Folia Microbiologica **51**(2): 114-120.
- Vos, C. M. F., K. De Cremer, B. P. A. Cammue and B. De Coninck (2014). "The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease." Molecular Plant Pathology: 1-13.
- Wada, S.-i., A. Iida, K. Asami, E. Tachikawa and T. Fujita (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." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1325**(2): 209-214.
- Wallner, A., Blatzer, M., Schrettl, M., Sarg, B., Lindner, H., Haas, H. (2009). "Ferrocrocin, a siderophore involved in intra- and transcellular iron distribution in *Aspergillus fumigatus*." Applied Environmental Microbiology(75): 4194-4196.
- Wang, G., Q. Li and P. Zhu (2008). "Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with the Hawaiian Sponges *Suberites zeteki* and *Gelliodes fibrosa*." Antonie Van Leeuwenhoek **93**(1-2): 163-74.
- Watanabe, N. (1984). "Bulletin of Faculty of Agriculture, Maiji University, Japan." **66**(45).

- Waters. Retrieved 17/02/2016, from http://www.waters.com/waters/fr_FR/Common-Ionization/nav.htm?cid=10073251&locale=fr_FR.
- Wei, X., F. Yang and D. C. Straney (2005). "Multiple non-ribosomal peptide synthetase genes determine peptaibol synthesis in *Trichoderma virens*." Canadian Journal of Microbiology **51**(5): 423-9.
- Weindling, R. (1934). "Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi." Phytopathology **24**: 1153-1179.
- .
- Whitmore, L. and B. A. Wallace (2004). "The Peptaibol Database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols." Nucleic Acids Research **32**(Database issue): D593-4.
- Wiest, A., D. Grzegorski, B. W. Xu, C. Goulard, S. Rebuffat, D. J. Ebbola, B. Bodo and C. Kenerley (2002). "Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase." Journal of Biological Chemistry **277**(23): 20862-8.
- Williamson, B., B. Tudzynski, P. Tudzynski and J. A. L. Van Kan (2007). "*Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease." Molecular Plant Pathology **8**(5): 561-580.
- Windham, M., Elad, Y., Baker, R., (1986). "A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp." Phytopathology **76**: 518-521.
- www.gcms.free.fr. (2006, 16/09/2006). Retrieved 17/02/2016, from <http://www.gcms.free.fr/10-analyseur.htm>.
- Xue, D., Geng, Xin (2015). COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING HEPATITIS B. United States.
- Yang, L., T. A. Harroun, T. M. Weiss, L. Ding and H. W. Huang (2001). "Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores." Biophysical Journal **81**(3): 1475-1485.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I., (1999). "Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*." Applied and Environmental Microbiology **65**: 1061-1070.
- Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y., Chet, I., (2001). "Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants " Plant and Soil **235**: 235-242.
- Yun, B. S., I. D. Yoo, Y. H. Kim, Y. S. Kim, S. J. Lee, K. S. Kim and W. H. Yeo (2000). "Peptaivirins A and B, two new antiviral peptaibols against TMV infection." Tetrahedron Letters **41**(9): 1429-1431.
- Zambias, R. A., C. James, M. L. Hammond, G. K. Abruzzo, K. F. Bartizal, K. H. Nollstadt, C. Douglas, J. Marrinan and J. M. Balkovec (1995). "Antifungal lipopeptides: Structure-activity relationships of 3-hydroxyglutamine-modified pneumocandin B0 derivatives." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **5**(20): 2357-2362.

Annexes

Annexe 1

Tableau A1-0-1: Ions fragments diagnostiques des peptaïbols à 15 résidus produits par *Trichoderma harzianum* (MMS 1255)

Type d'ions	Ions (m/z)									
	TH-15-I	TH-15-IIa	TH-15-IIb	TH-15-IIla	TH-15-IIlb	TH-15-IIlc	TH-15-IVa	TH-15-IVb	TH-15-Va	TH-15-Vb
Fractions CLHP 2-10- t _R [min]	4 27,0–30,0	5 30,0–32,0	6 32,0–35,5	7 35,5–39,0	8 39,0–41,0	9 41,0–47,0	9–12 41,0–67,0	10, 12 47,0–50,0 57,0–60,0	10–12 47,0–60,0	10 47,0–50,0
[M + Na] ⁺	1478,8	1492,8	1492,8	1506,8	1506,8	1506,8	1520,8	1520,8	1534,8	1534,8
[M + 2Na] ²⁺	750,9	757,9	757,9	764,9	764,9	764,9	771,9	771,9	779,9	779,9
[M + Na – H ₂ O] ⁺	1460,8	1474,8	1474,8	1488,8	1488,8	1488,8	1502,8	1502,8	1516,8	1516,8
[M + H] ⁺	1456,8	1470,8	1470,8	1484,8	1484,8	1484,8	1498,8	1498,8	1512,8	1512,8
b ₅	n.d.	n.d.	n.d.	476,2	n.d.	476,2	490,2	476,2	490,2	n.d.
b ₆	604,3	604,3	604,3	604,3	n.d.	604,3	618,3	604,3	618,3	632,3
b ₇	689,3	689,3	703,3	703,3	n.d.	703,3	717,3	703,3	717,3	731,3
b ₈	788,4	802,4	802,4	816,4	816,4	816,4	830,4	816,4	830,4	844,4
b ₉	873,5	887,5	887,5	901,5	901,5	901,5	915,5	901,5	915,5	929,5
b ₁₀	944,5	958,5	958,5	972,5	972,5	972,5	986,5	972,5	986,5	1000,5
b ₁₁	1029,5	1043,5	1043,5	1057,5	1057,5	1057,5	1071,5	1071,5	1085,5	1085,5
b ₁₂	1114,6	1128,6	1128,6	1142,6	1142,6	1142,6	1156,6	1156,6	1170,6	1170,6
b ₁₃	1199,6	1213,6	1213,6	1227,6	1227,6	1227,6	1241,6	1241,6	1255,6	1255,6
b ₁₄	1327,7	1341,7	1341,7	1355,7	1355,7	1355,7	1369,7	1369,7	1383,7	1383,7
a ₅	448,2	n.d.	n.d.	448,2	n.d.	448,2	462,2	448,2	462,2	n.d.
a ₆	576,3	576,3	576,3	576,3	n.d.	576,3	590,3	576,3	590,3	604,3
a ₇	661,3	661,3	675,3	675,3	689,3	675,3	689,3	675,3	689,3	703,3
a ₈	760,4	774,4	774,4	788,4	788,4	788,4	802,4	788,4	802,4	816,4
a ₉	845,5	859,5	859,5	873,5	873,5	873,5	887,5	873,5	887,5	901,5
a ₁₀	916,5	930,5	930,5	944,5	944,5	944,5	958,5	944,5	958,5	972,5
a ₁₁	1001,5	1015,5	1015,5	1029,5	1029,5	1029,5	1043,5	1043,5	1057,5	1057,5
a ₁₂	1086,6	1100,6	1100,6	1114,6	1114,6	1114,6	1128,6	1128,6	1142,6	1142,6
a ₁₃	1171,6	1185,6	1185,6	1199,6	1199,6	1199,6	1213,6	1213,6	1227,6	1227,6
a ₁₄	1299,7	1313,7	1313,7	1327,7	1327,7	1327,7	1341,7	1341,7	1355,7	1355,7
y _{6P}	n.d.	n.d.	n.d.	628,4	n.d.	n.d.	628,4	642,4	642,4	628,4
y _{7P}	713,4	713,4	713,4	713,4	n.d.	713,4	713,4	727,4	727,4	713,4
y _{8P}	812,5	826,5	812,5	826,5	812,5	826,5	826,5	840,5	840,5	826,5
y _{9P}	897,5	911,5	911,5	925,5	911,5	925,5	925,5	939,5	939,5	925,5
y _{10P}	1025,6	1039,6	1039,6	1053,6	1039,6	1053,6	1053,6	1067,6	1067,6	1053,6
y _{11P}	1110,7	1124,7	1124,7	1138,7	1138,7	1138,7	1152,7	1152,7	1166,7	1152,7
y _{12P}	1223,7	1237,7	1237,7	1251,7	1251,7	1251,7	1265,7	1265,7	1279,7	1265,7
y _{13P}	1294,8	1308,8	1308,8	1322,8	1322,8	1322,8	1336,8	1336,8	1350,8	1336,8
y _{14P}	1351,8	1365,8	1365,8	1379,8	n.d.	1379,8	1393,8	1393,8	1407,8	1407,8
[M – H] [–]	1454,8	1468,8	1468,8	1482,8	1482,8	1482,8	1496,8	1496,8	1510,8	1510,8
[M – H – H ₂ O] [–]	1436,8	1450,8	1450,8	1464,8	1464,8	1464,8	1478,8	1478,8	1492,8	1492,8
y _{4N}	n.d.	448,3	448,3	448,3	n.d.	n.d.	448,3	448,3	448,3	448,3
y _{5N}	n.d.	533,3	533,3	533,3	533,3	n.d.	533,3	547,3	547,3	533,3
y _{6N}	604,4	604,4	604,4	604,4	604,4	604,4	604,4	618,4	618,4	604,4
y _{7N}	689,4	689,4	689,4	689,4	689,4	n.d.	689,4	703,4	703,4	689,4
y _{8N}	788,5	802,5	788,5	802,5	788,5	802,5	802,5	816,5	816,5	802,5
y _{9N}	873,5	887,5	887,5	901,5	887,5	901,5	901,5	915,5	915,5	901,5
y _{10N}	1001,6	1015,6	1015,6	1029,6	1015,6	1029,6	1029,6	1043,6	1043,6	1029,6
y _{11N}	1086,7	1100,7	1100,7	1114,7	1114,7	1114,7	1128,7	1128,7	1142,7	1128,7
y _{12N}	1199,7	1213,7	1213,7	1227,7	1227,7	1227,7	1241,7	1241,7	1255,7	1241,7
y _{13N}	1270,8	1284,8	1284,8	1298,8	1298,8	1298,8	1312,8	1312,8	1326,8	1312,8
y _{14N}	1327,8	1341,8	1341,8	1355,8	1355,8	1355,8	1369,8	1369,8	1383,8	1383,8
n.d. non détecté										

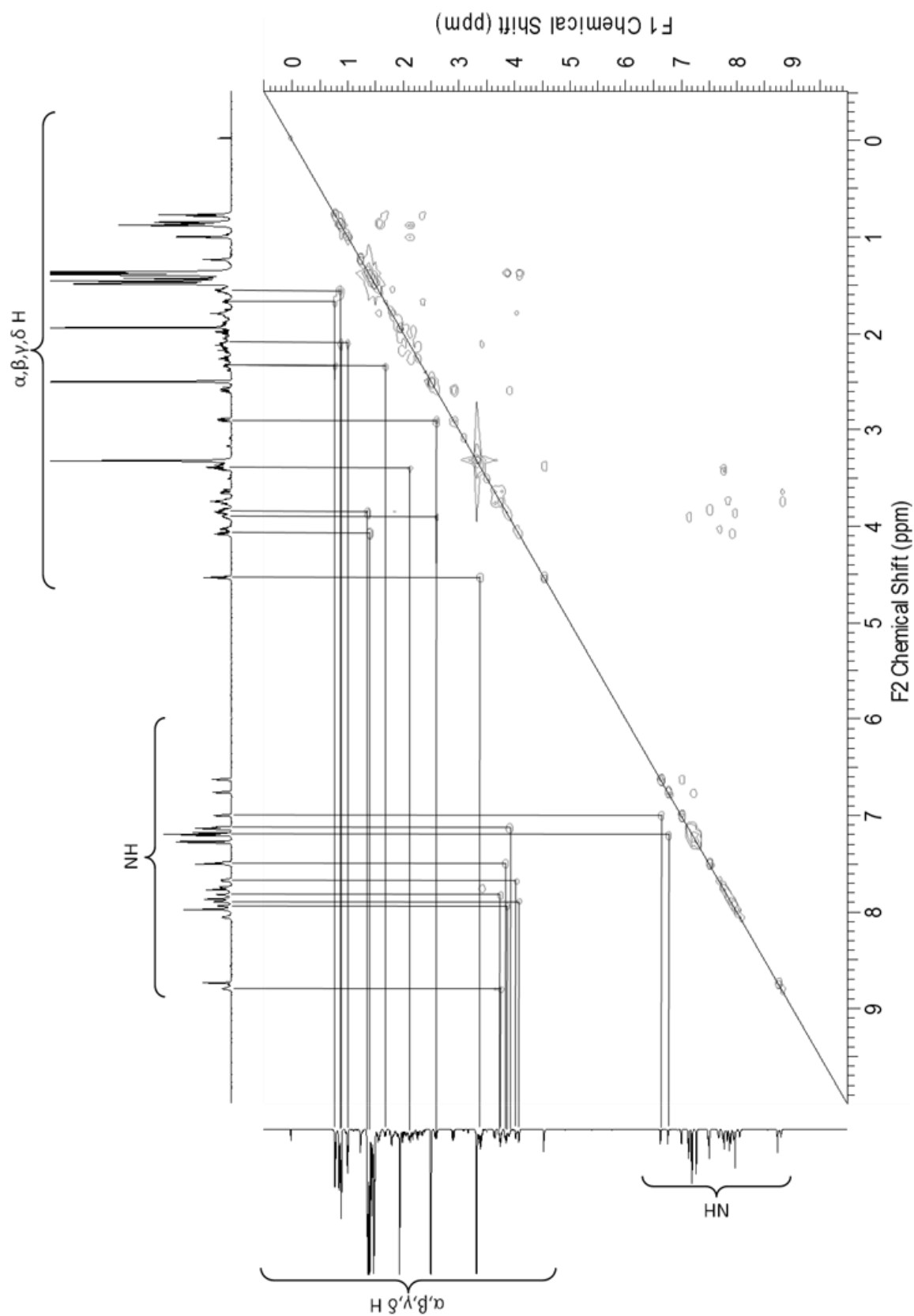


Figure A1-1 : Spectre RMN 2D-COSY du peptaïbol TH-15-IIb



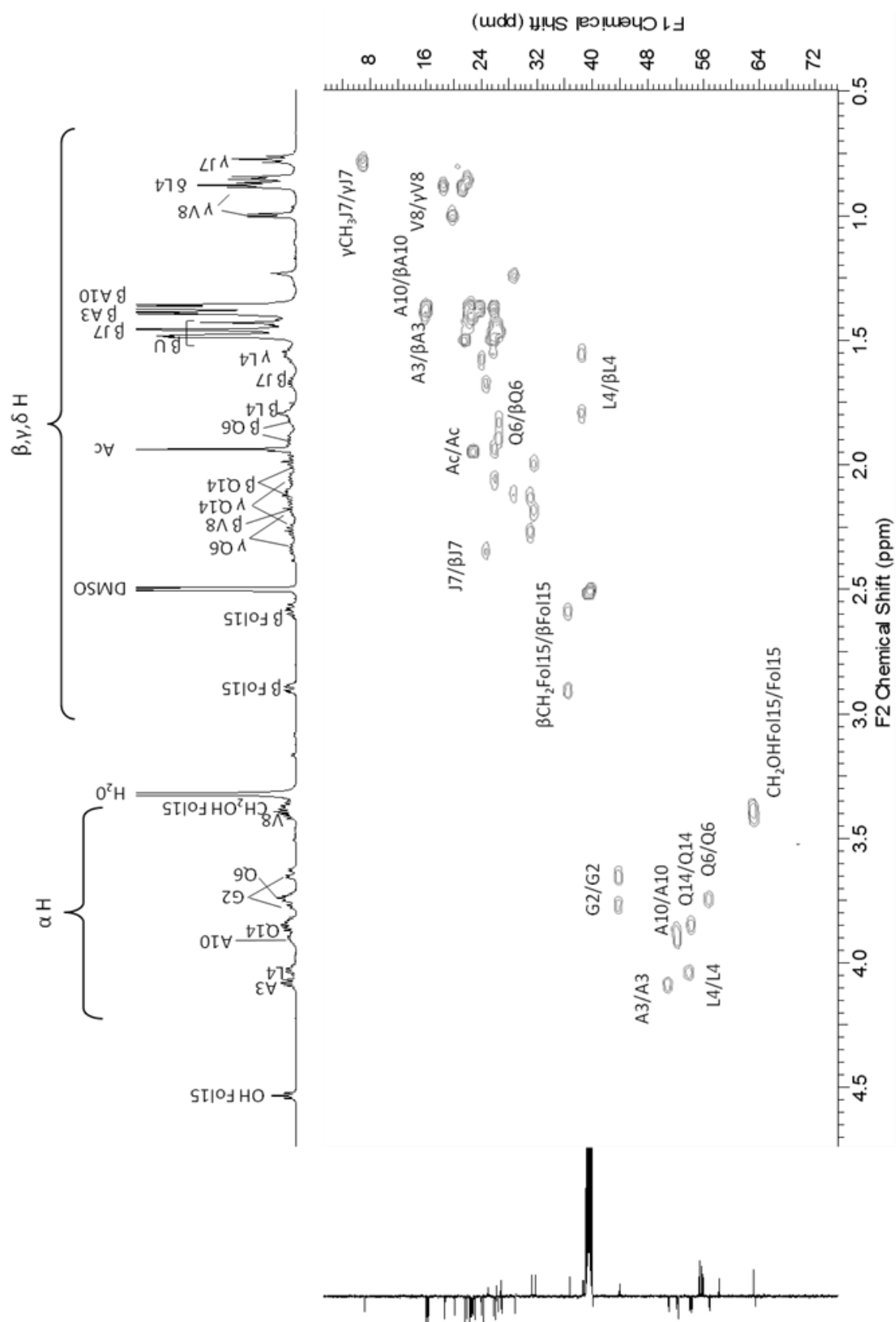


Figure A1-3 : Spectre RMN 2D-HSQC proton 4,5-1,0 ppm/carbone 70-10 ppm du peptaïbol TH-15-IIb (600 MHz, DMSO- d_6 , 298K)

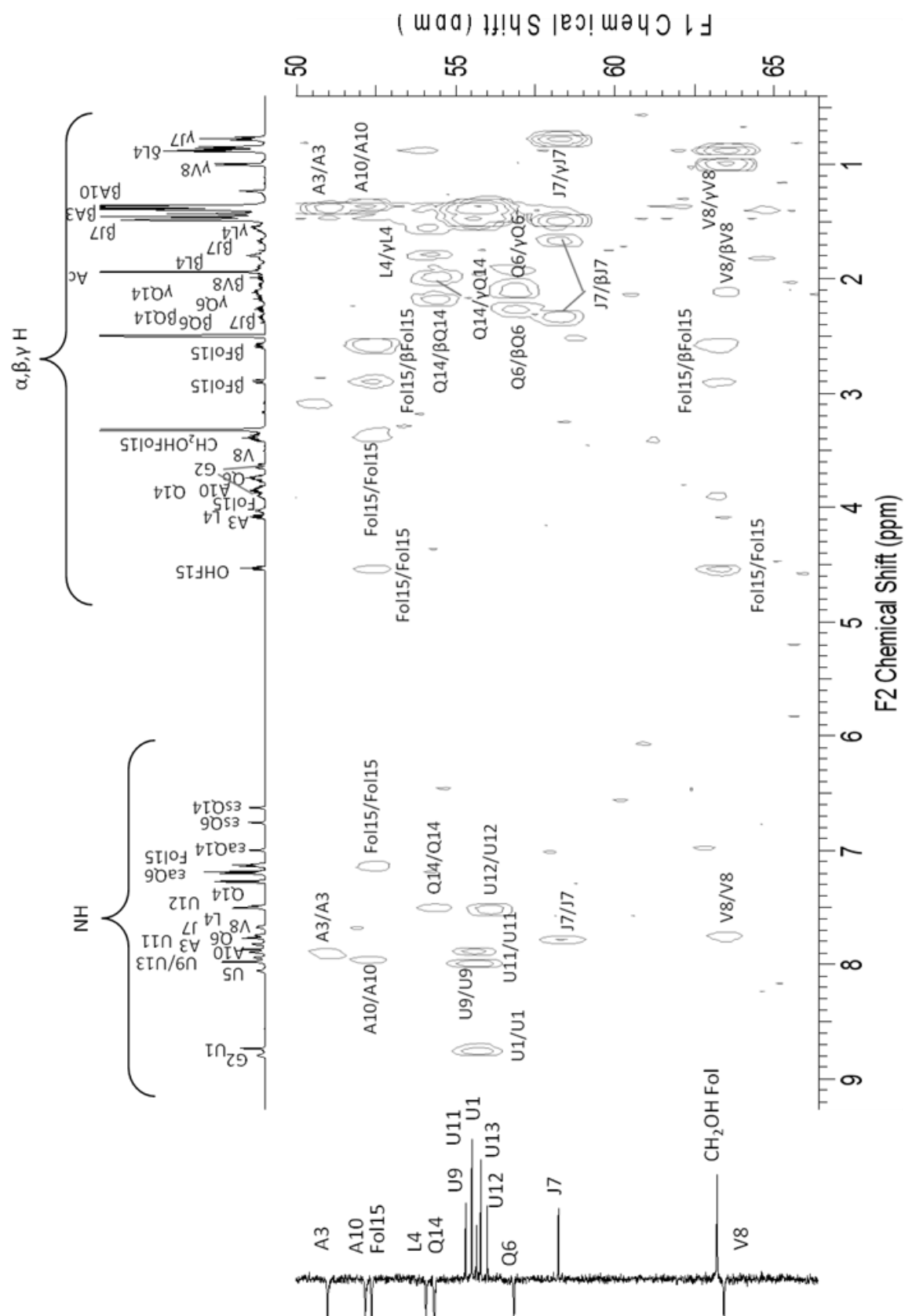
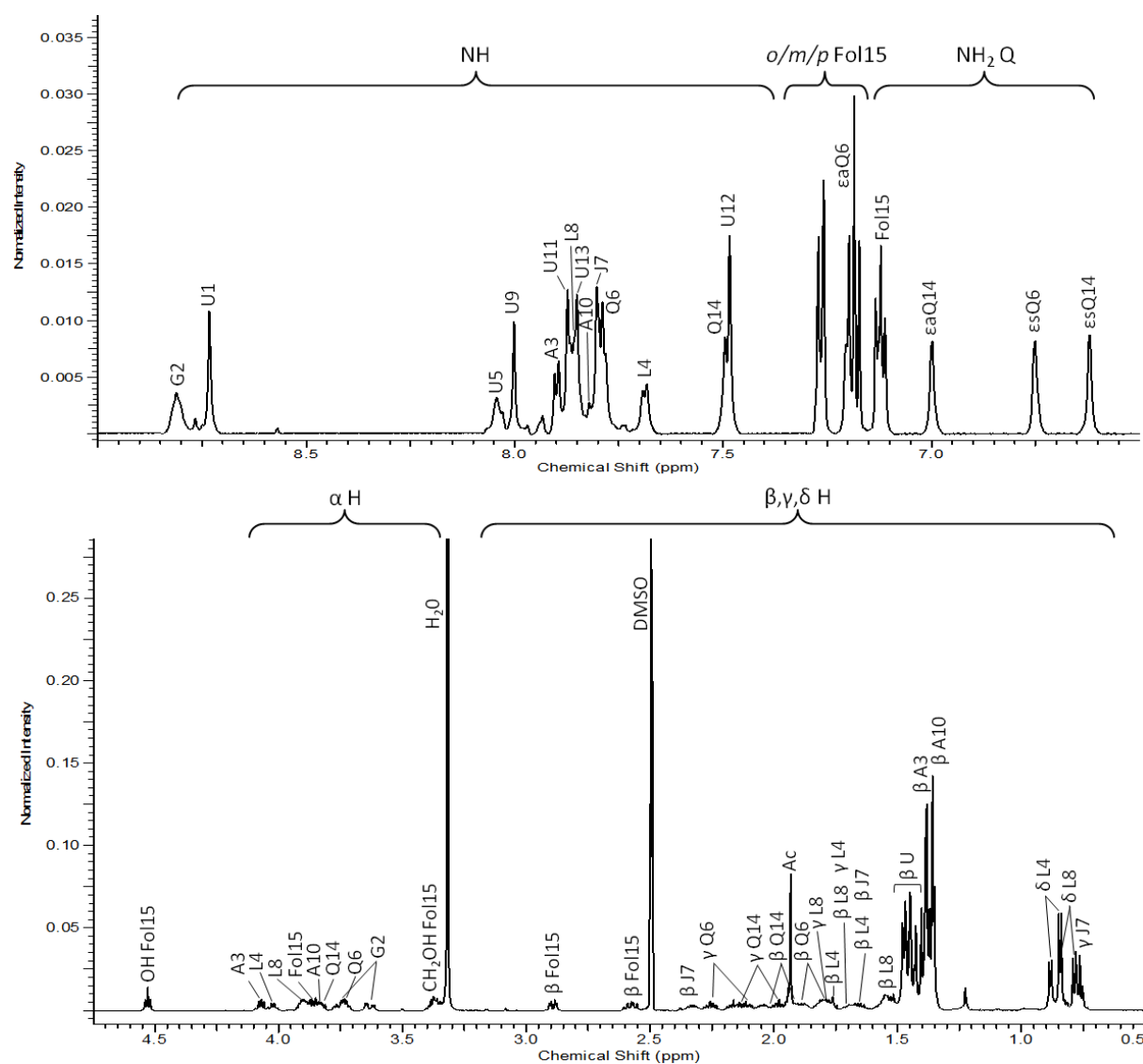


Figure A1-4 : Spectre RMN 2D- HMBC carbone 66-50 ppm / proton 9-0,5 ppm du peptaïbol TH-15-IIb (600 MHz, DMSO- d_6 , 298K)

Tableau A1-0-2 : Données RMN ^{13}C et ^1H du peptaïbol TH-15-IIb (600 MHz, DMSO- d_6 , 298 K)

Résidu		$\square_{\text{C}}$	$\square_{\text{H}}$	m (J Hz)	Résidu		$\square_{\text{C}}$	$\square_{\text{H}}$	m (J Hz)
Ac₀	CO	171,0	-		Aib₉	CO	175,5	-	
	α CH ₃	23,1	1,90	s		NH	-	7,96	s
Aib₁	CO	176,4	-			α C	55,3	-	
	NH	-	8,73	s		β CH ₃	(*)	(**)	s
	α C	55,6	-			β' CH ₃	(*)	(**)	s
	β CH ₃	(*)	0	s					
	β' CH ₃	(*)	0	s					
Gly₂	CO	171,6	-		Ala₁₀	CO	174,3	-	
	NH	-	8,79	brdd		NH	-	7,93	d (4,7)
	α CH ₂	43,9	3,74	dd (16,2 ; 6,6)		α CH	52,2	3,85	m
		-	3,64	dd (16,2 ; 5,0)		β CH ₃	16,4	1,35	d (5,5)
Ala₃	CO	175,2	-		Aib₁₁	CO	175,2	-	
	NH	-	7,88	d (5,9)		NH	-	7,86	s
	α CH	51,0	4,07	dq (5,9; 7,5)		α C	55,5	-	
	β CH ₃	16,1	1,36	d (7,5)		β CH ₃	(*)	(**)	s
						β' CH ₃	(*)	(**)	s
Leu₄	CO	173,6	-		Aib₁₂	CO	175,5	-	
	NH	-	7,66	d (6,3)		NH	-	7,49	s
	α CH	54,1	4,02	m		α C	56,0	-	
	β CH ₂	38,7	1,79	m		β CH ₃	(*)	(**)	s
		-	1,55	m		β' CH ₃	(*)	(**)	s
	γ CH	24,3	1,54	m					
	δ CH ₃	22,3	0,84	d (6,3)					
	δ' CH ₃	21,6	0,86	d (6,5)					
Aib₅	CO	176,1	-		Aib₁₃	CO	174,5	-	
	NH	-	8,04	s		NH	-	7,96	s
	α C	55,5	-			α C	55,8	-	
	β CH ₃	(*)	(**)	s		β CH ₃	(*)	(**)	s
	β' CH ₃	(*)	(**)	s		β' CH ₃	(*)	(**)	s
Gln₆	CO	173,1	-		Gln₁₄	CO	171,2	-	
	NH	-	7,81	d (4,1)		NH	-	7,49	d
	α CH	56,8	3,73	m		α CH	54,3	3,82	m
	β CH ₂	26,1	1,89	m		β CH ₂	26,0	2,04	m
		-	1,81	m			-	1,92	m
	γ CH ₂	31,2	2,26	m		γ CH ₂	31,8	2,17	m
		-	2,11	m			-	1,98	m
	δ CO	173,2	-			δ CO	173,4	-	
	ϵ NH ₂ <i>anti</i>	-	7,20	s		ϵ NH ₂ <i>anti</i>	-	6,99	s
	ϵ NH ₂ <i>syn</i>	-	6,75	s		ϵ NH ₂ <i>syn</i>	-	6,61	s
Iva₇	CO	176,6	-		Pheol₁₅				
	NH	-	7,76	s		NH	-	7,12	m
	α C	58,1	-			α CH	52,4	3,89	m
	β CH ₂	25,0	2,33	dq		β CH ₂	36,7	2,89	dd (13,6 ; 4,4)
		-	1,66	dq			-	2,57	dd (13,6 ; 9,1)
	β CH ₃	21,9	1,48	s		β' CH ₂ OH	63,2	3,37	m
	γ CH ₃	7,2	0,76	d (7,4; 7,4)			-	3,37	m
Val₈	CO	172,7	-			OH	-	4,52	dd (6,1 ; 6,1)
	NH	-	7,74	d (5,1)		C-1	139,2	-	
	α CH	63,4	3,39	m		C-2,6	129,3	7,27	m (d)
	β CH	28,8	2,10	m		C-3,5	127,8	7,14	m (t)
	γ CH ₃	18,8	0,99	d (6,4)		C-4	125,7	7,12	t
	γ' CH ₃	21,1	0,86	d (6,5)					

(*) $\square_{\text{C}}$ β/β' CH₃ interchangeables (26,9 ; 26,5 ; 26,1 ; 26,0 ; 25,6 ; 24,0 ; 22,8 ; 22,7 ; 22,6 ; 22,4 ; 21,6)(**) $\square_{\text{H}}$ β/β' CH₃ non déterminés (1,35-1,5 ppm)

Figure A1-5 : Spectre RMN 1D- ^1H du peptaibol TH-15-IIIa

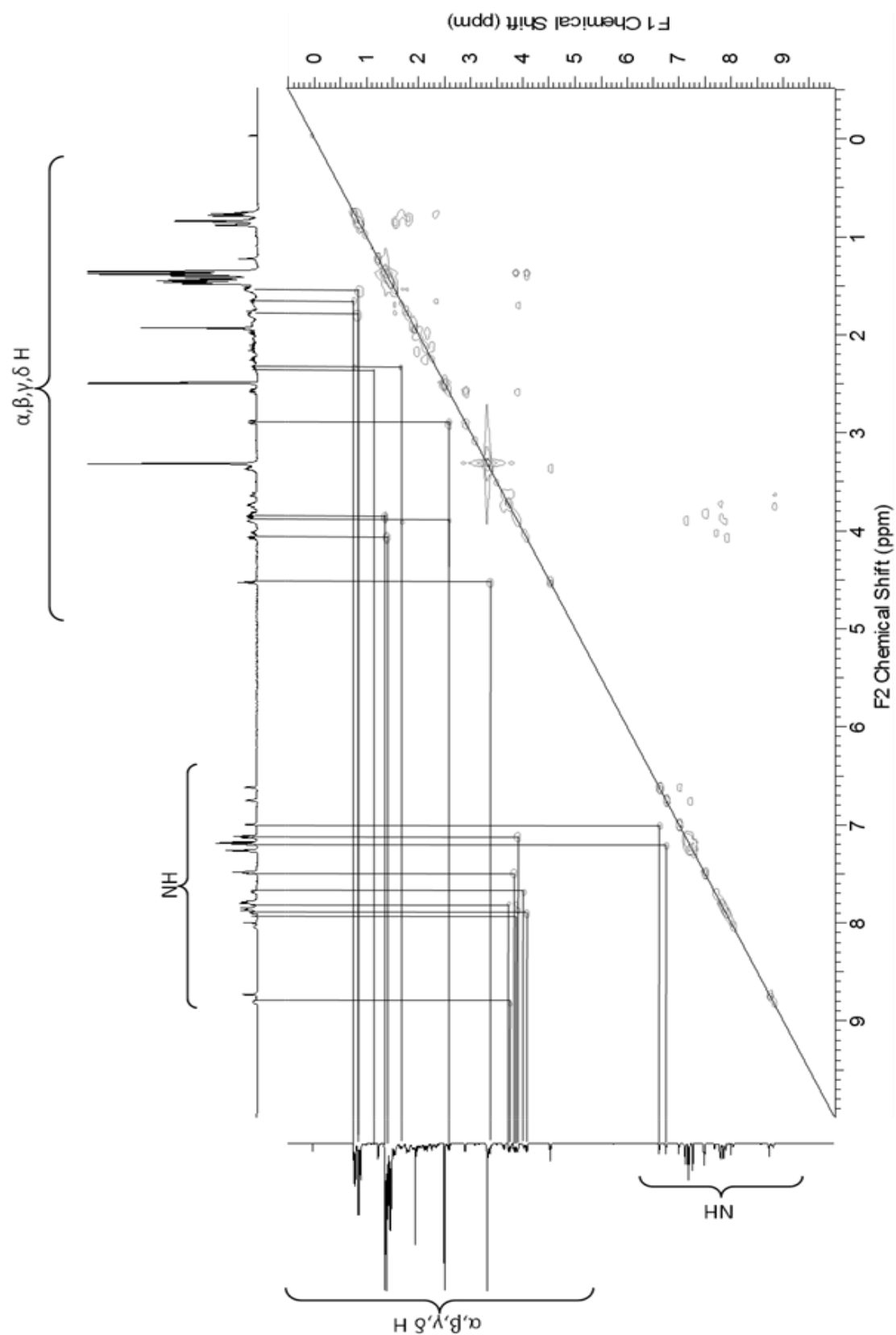


Figure A1-6 : Spectre RMN 2D-COSY du peptaïbol TH-15-IIIa

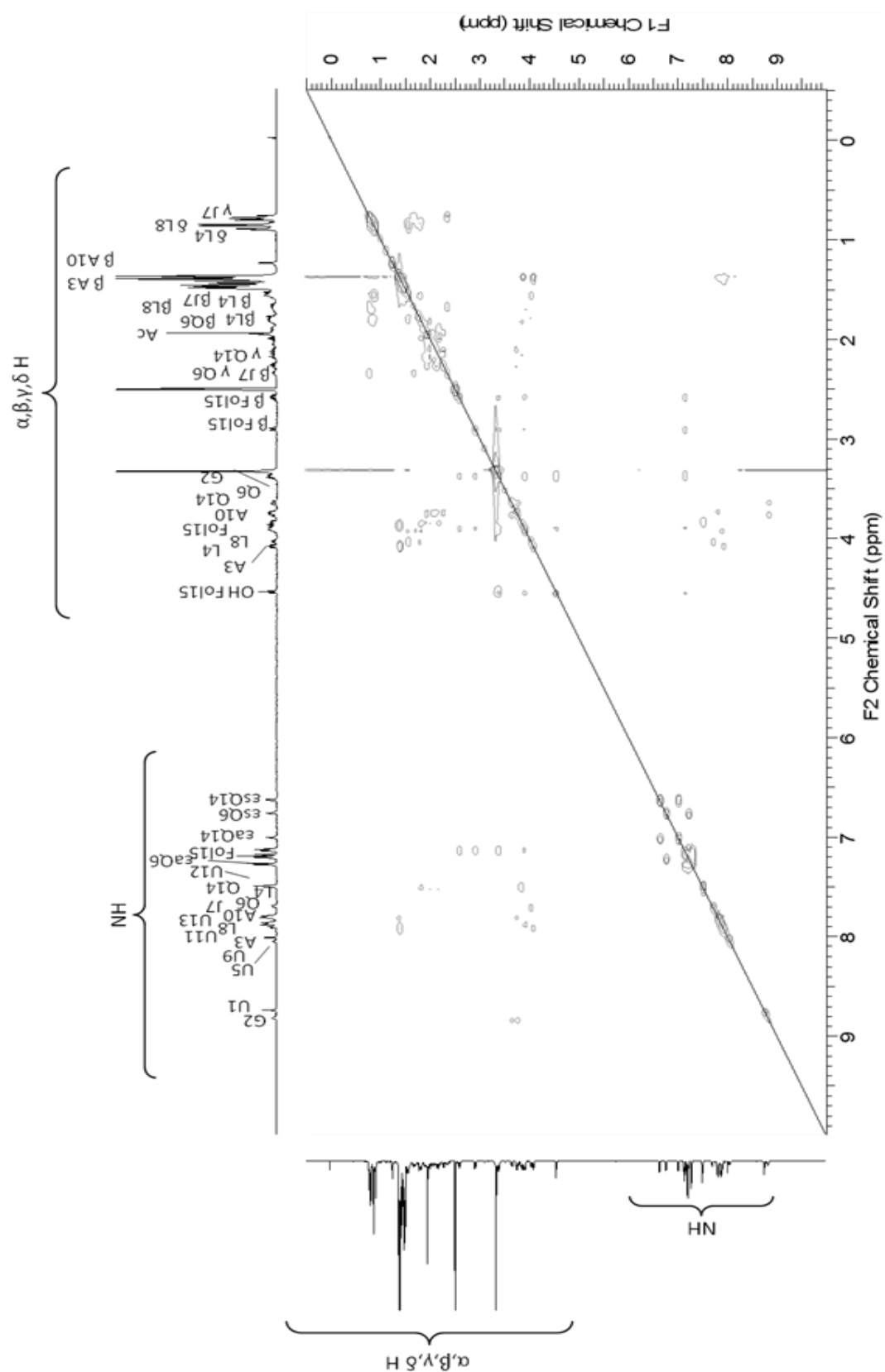


Figure A1-7 : Spectre RMN 2D-TOCSY du peptaïbol TH-15-IIIa

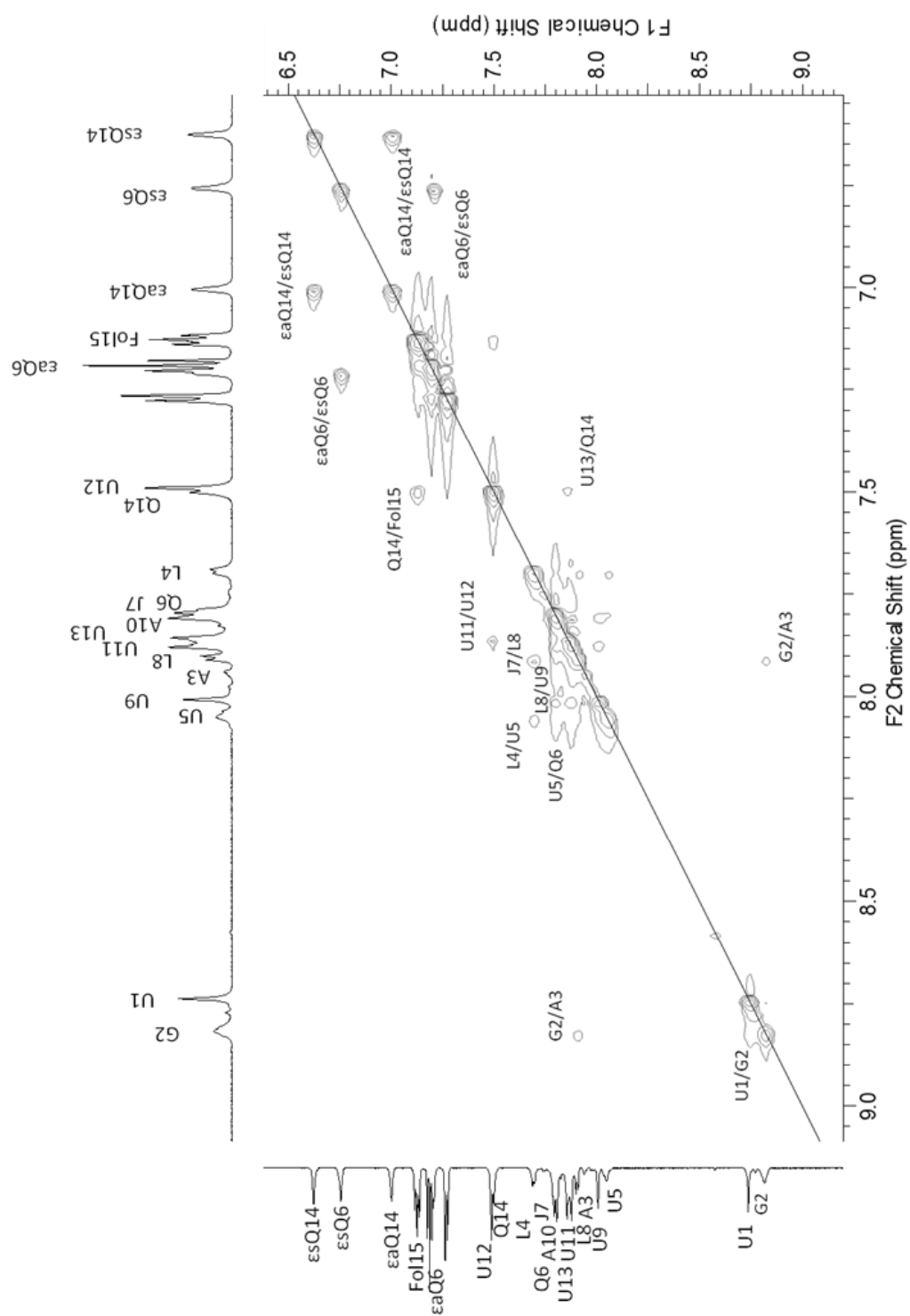


Figure A1-8 : Spectre RMN 2D-NOESY région des protons amides du peptaïbol TH-15-IIIa

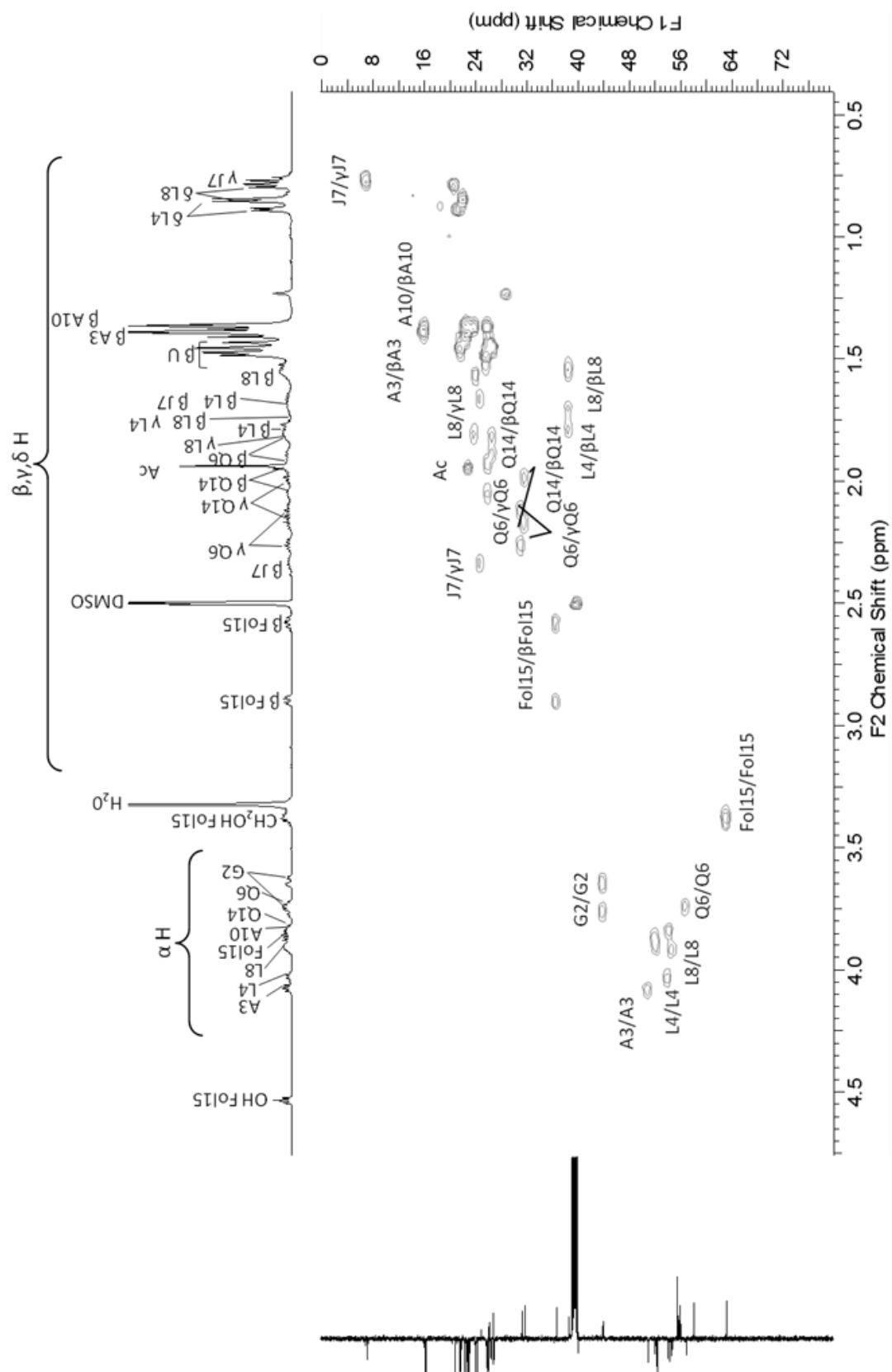


Figure A1-9 : Spectre RMN 2D- HSQC carbone 10-70/ proton 1-4 ppm du peptaïbol TH-15-IIIa

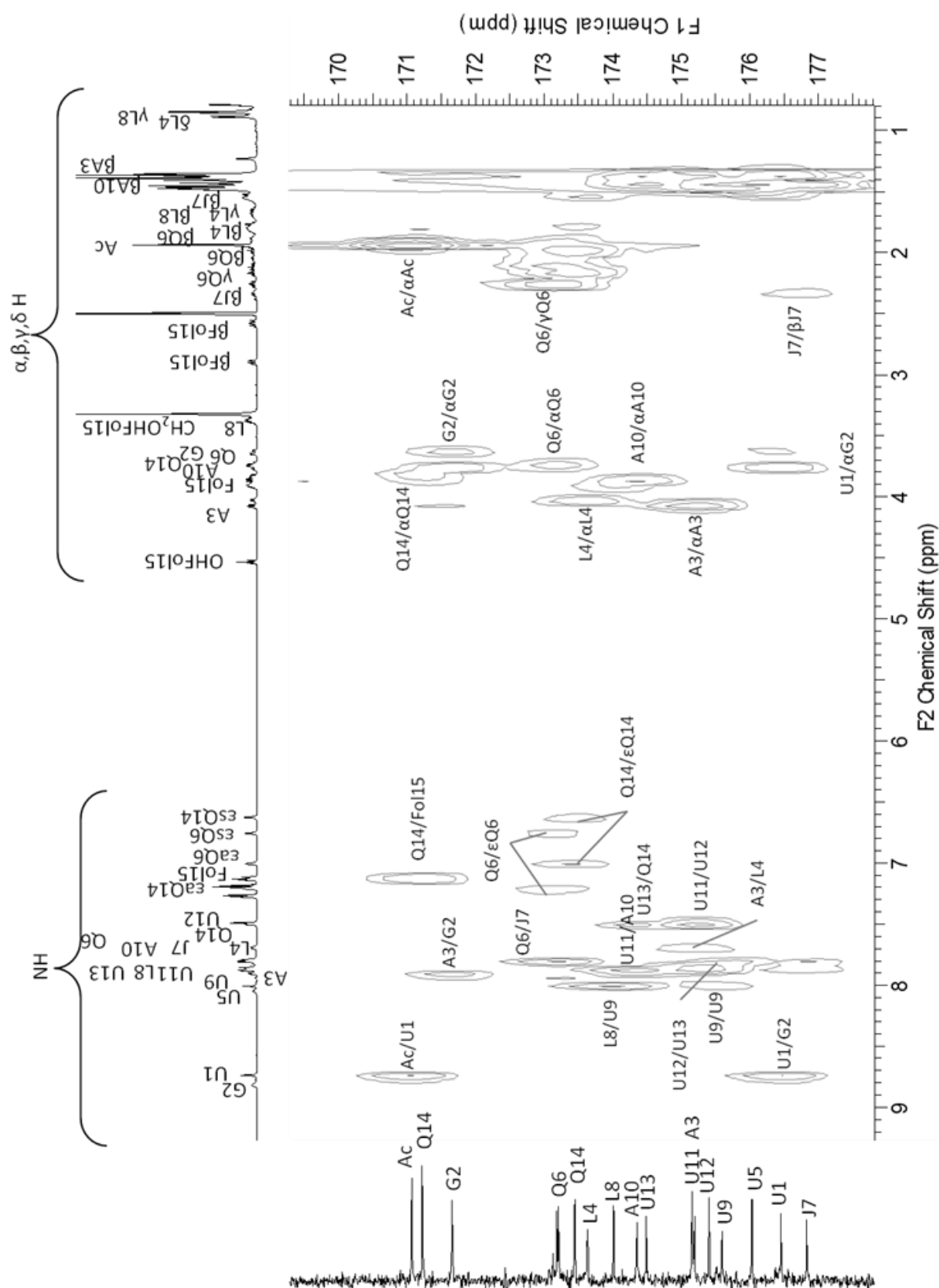


Figure A-10 : Spectre RMN 2D-HMBC carbone 170-180 ppm / proton 0,5-9 ppm du peptaïbol TH-15-IIIa (600 MHz, DMSO-*d*₆, 298K)

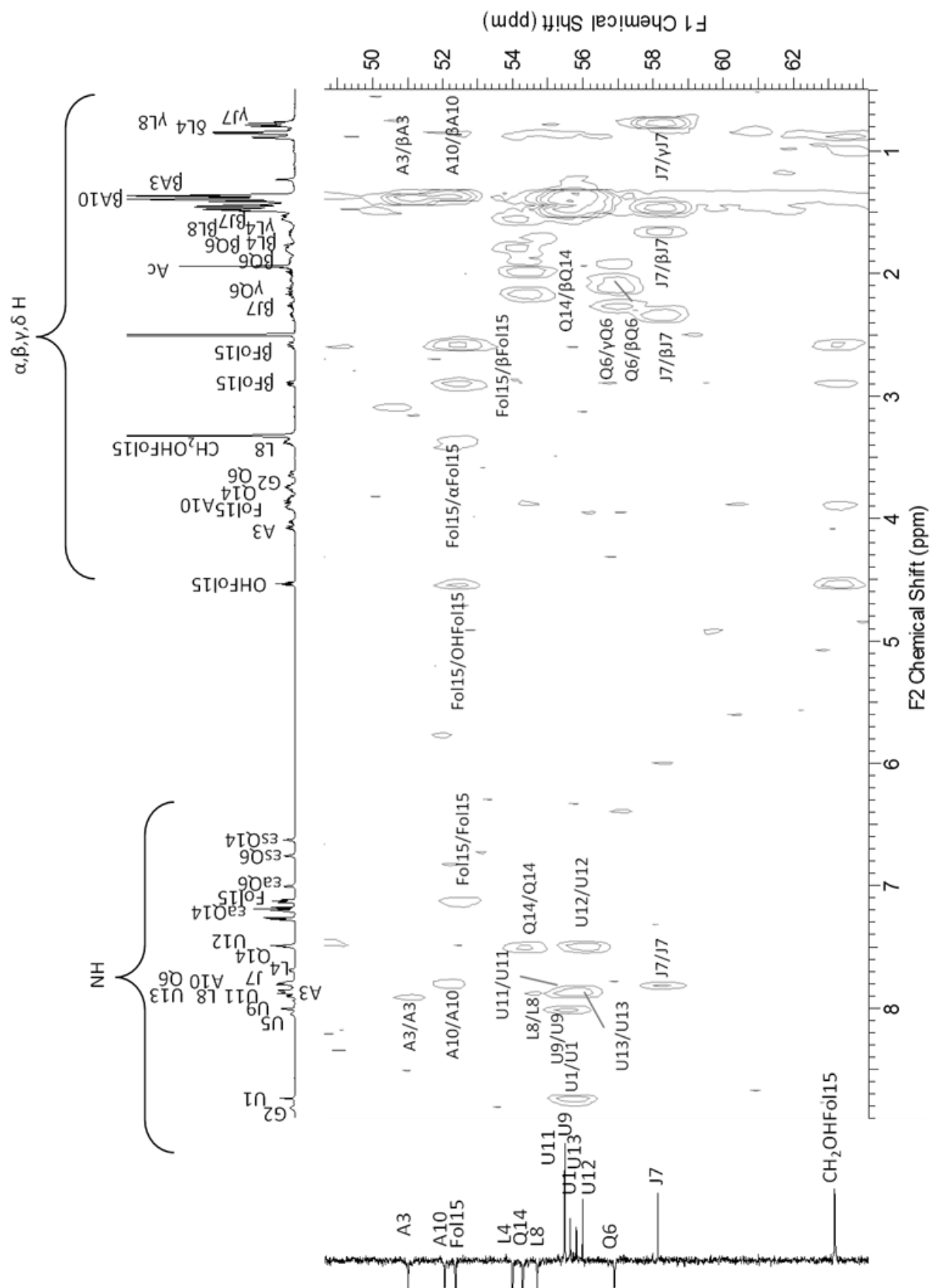


Figure A1-11 : Spectre RMN 2D-HMBC carbone 51-64 ppm / proton 0,5-9 ppm du peptaïbol TH-15-IIIa (600 MHz, DMSO-*d*₆, 298K)

Tableau A1-0-3 : Données RMN ^{13}C et ^1H du peptaïbol TH-15-IIIa (600 MHz, DMSO- d_6 , 298 K)

Résidu		δ_{C}	δ_{H}	m (J Hz)	Résidu		δ_{C}	δ_{H}	m (J Hz)
Ac₀	CO	171,1	-		Leu₈ (suite)	δ CH ₃	22,2	0,85	d (6,4)
	α CH ₃	23,1	1,93	s		δ' CH ₃	20,8	0,78	d (6,6)
Aib₁	CO	176,4	-		Aib₉	CO	175,6	-	
	NH	-	8,73	s		NH	-	8,00	s
	α C	55,6	-			α C	55,5	-	
	β CH ₃	(*)	(**)	s		β CH ₃	(*)	(**)	s
	β' CH ₃	(*)	(**)	s		β' CH ₃	(*)	(**)	s
Gly₂	CO	171,6	-		Ala₁₀	CO	174,3	-	
	NH	-	8,89	brdd		NH	-	7,81	m
	α CH ₂	43,9	3,75	dd (16,3 ; 5,9)		α CH	52,0	3,84	m
		-	3,63	dd (16,3 ; 4,7)		β CH ₃	16,3	1,35	m
Ala₃	CO	175,2	-		Aib₁₁	CO	175,1	-	
	NH	-	7,90	d (5,6)		NH	-	7,87	s
	α CH	51,0	4,07	dq (6,4 ; 7,0)		α C	55,5	-	
	β CH ₃	16,1	1,36	d (7,0)		β CH ₃	(*)	(**)	s
Leu₄						β' CH ₃	(*)	(**)	s
	CO	173,6	-		Aib₁₂	CO	175,4	-	
	NH	-	7,68	d (5,9)		NH	-	7,48	s
	α CH	54,0	4,03	dd (7,0 ; 7,0 ; 7,0)		α C	56,0	-	
	β CH ₂	38,7	1,76	m		β CH ₃	(*)	(**)	s
		-	1,65	m		β' CH ₃	(*)	(**)	s
	γ CH	24,3	1,70	m	Aib₁₃	CO	174,5	-	
	δ CH ₃	22,3	0,84	d (6,4)		NH	-	7,85	s
	δ' CH ₃	21,8	0,88	d (6,4)		α C	55,8	-	
Aib₅	CO	176,0	-			β CH ₃	(*)	(**)	s
	NH	-	8,04	s		β' CH ₃	(*)	(**)	s
	α C	55,5	-		Gln₁₄	CO	171,2	-	
	β CH ₃	(*)	(**)	s		NH	-	7,49	d (6,5)
	β' CH ₃	(*)	(**)	s		α CH	54,3	3,83	ddd
Gln₆	CO	173,2	-			β CH ₂	26,8	2,04	m
	NH	-	7,78	m			-	1,92	m
	α CH	56,9	3,73	m		γ CH ₂	31,8	2,14	m
	β CH ₂	26,1	1,89	m			-	1,98	m
		-	1,80	m		δ CO	173,4	-	
	γ CH ₂	31,3	2,24	ddd		ϵ NH ₂ <i>anti</i>	-	7,00	s
		-	2,11	ddd		ϵ NH ₂ <i>syn</i>	-	6,62	s
	δ CO	173,1	-		Pheol₁₅	NH	-	7,12	d
	ϵ NH ₂ <i>anti</i>	-	7,21	s		α CH	52,4	3,86	m
	ϵ NH ₂ <i>syn</i>	-	6,75	s		β CH ₂	36,7	2,89	dd (13,6 ; 4,5)
Iva₇	CO	176,8	-				-	2,57	dd (13,6 ; 9,2)
	NH	-	7,78	s		β' CH ₂ OH	63,2	3,37	m
	α C	58,1	-				-	3,37	m
	β CH ₂	24,9	2,32	dq		OH	-	4,53	dd (6,2 ; 6,2)
		-	1,65	dq		C-1	139,2	-	m (d) (8,4)
	β CH ₃	21,8	1,48	s		C-2,6	129,3	7,26	m (t) (8,4 ; 8,4)
Leu₈	γ CH ₃	7,2	0,76	dd (7,6 ; 7,6)		C-3,5	127,8	7,13	t (8,4 ; 8,4)
	CO	174,0	-			C-4	125,7	7,12	
	NH	-	7,85	m					
	α CH	54,7	3,87	dddm					
	β CH ₂	38,7	1,70	m					
		-	1,53	m					
	γ CH	24,1	1,80	m					

(*) δ_{C} β/β' CH₃ interchangeables (26,9 ; 26,4 ; 26,0 ; 26,0 ; 25,8 ; 25,7 ; 24,0 ; 22,8 ; 22,7 ; 22,6 ; 22,2 ; 21,5)(**) δ_{H} β/β' CH₃ non déterminés (1,35-1,5 ppm)

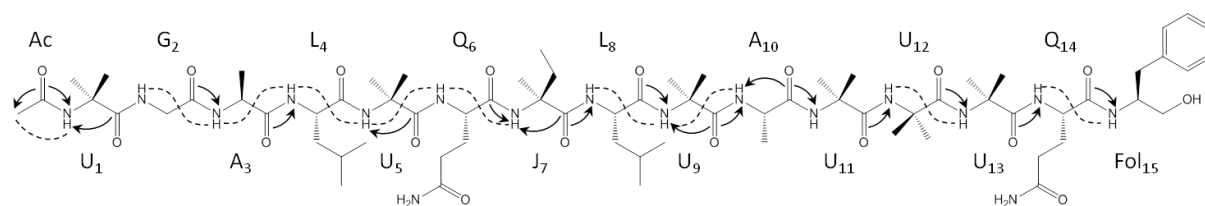


Figure A1-12 : Structure du peptaibol TH-15-IIIa avec les corrélations HMBC (→) et NOESY (---)

Annexe 2

>mms1255-tef1

```
TTTCATATTCAATTGTGCACGGCGATTCTGAAGGGAATTTTCGTGTCGACAACTTTTCGTACCCCGCTTTCATTACCCCTCC
TTTGCAGCGACGCAAATTTTTTGTCTGCTTTTGGCTTTAGTGGGGTTTTTTGTGCACCCCACTAGCTCACTGCATTTTTTTT
TGGCTTCACTCTCACTTCCTAGCCATTCAACGTGCTCTGCGTCTTTGGTCATTTAGCGATGCTAACCCTTTTCCACCAACAG
GAAGCCGCCGAACCTCGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCAC
CATCGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTACCGTCATTGGTATGTCTTCATTATCAACTTCATGCT
GCAATTGCAGGCCAGTGCTAACAGGCAATTCACAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACTT
CCCAGGCTGACTGCGCCATTCTCATCATTGCCGCTGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACTCGT
GAGCACGCTCTGCTCGCCTACACCCTGGGTGTCAAGCAGCTCATCGTTGCCATCAACAAGATGGACTGCCAAGTGGGCCGA
GGCTCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACTTCCAACCTTCATCAAGAAGGTCGGCTTCAACCCCAAGGCTGTTGCTTTCGTCC
CCATCTCCGGCTTCAACGGTGACAACATGCTCCAGCCCTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGCTGGGAGAAGGAGACCAAG
GCTGGCAAGTTCACCGGCAAGACCCTCCTTGAGGCCATCGACTCCATCGAGCCCCCAAGCGTCCCACGGACAAGCCCCTCCG
TCTTCCCCTCCAGGATGTCTACAAGATCGGTGGTATTGGAACAGTTCCCGTCGGCCGTATCGAGACTGGTATCCTCAAGCCCG
GTATGGTCGTCACCTTCGCTCCCTCCAACGTCAACACTGAAGTCAAGTCCGTCGARATGCACCACGAGCAGCTCGTCCAGGGT
GTCCCGGTGAMAACGTTGGTTTCAACGTCAAGAACGTTTCCGTTAAGGAAATTCGCCGTGGTAACGTTGCCGGTGACTCCAAAA
```

Figure A2-13 : Séquence du gène *tef1* de l'ADN de la souche MMS 1255.

Annexe 3

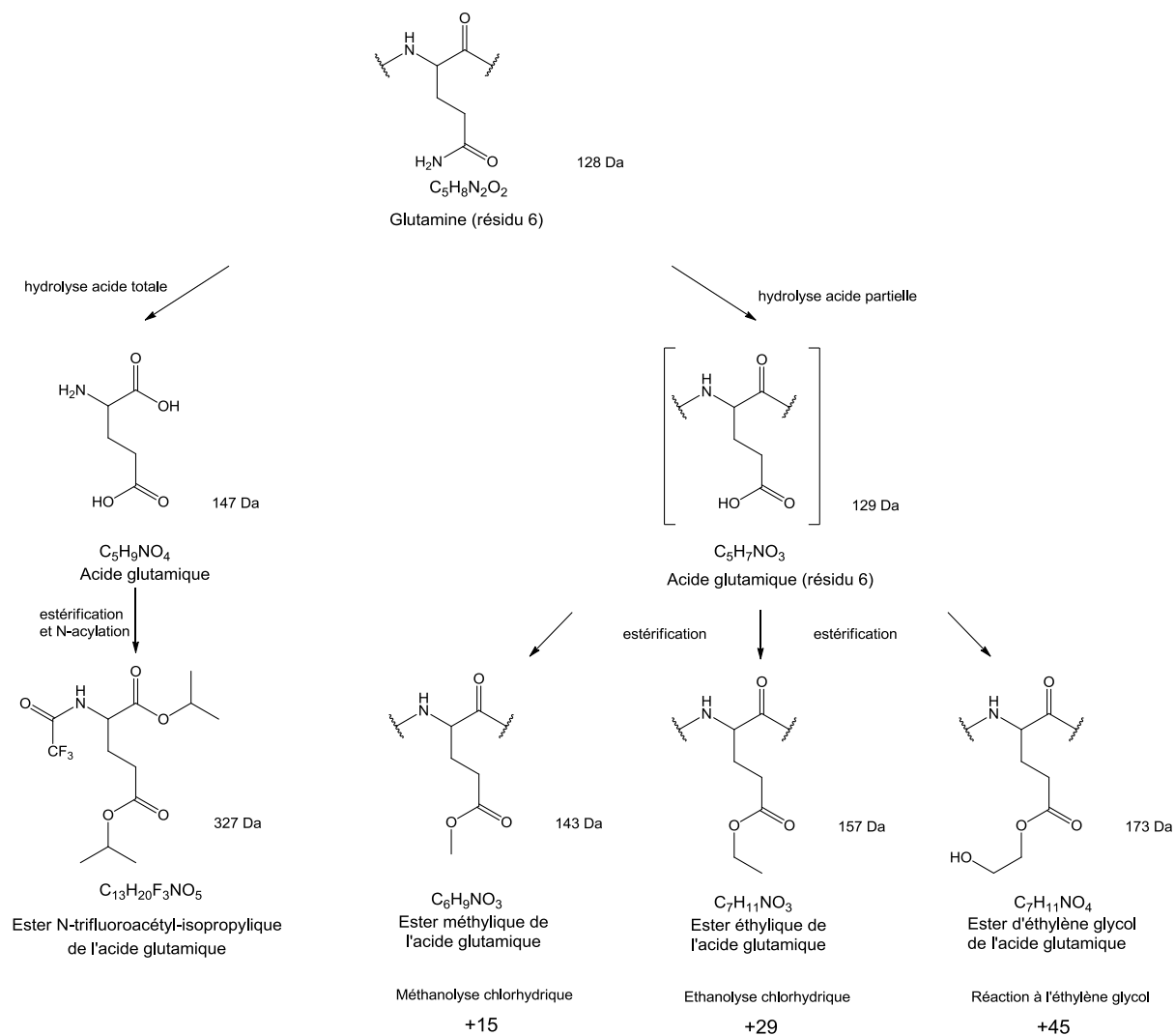


Figure A3-14 : Modifications structurales du résidu Gln₆ des peptaïbiotiques à 17 résidus produits par *T. atroviride* MMS 927

Thèse de Doctorat

Anne-Isaline VAN BOHEMEN

Métabolites de *Trichoderma* marins : Identification, quantification et valorisation en biocontrôle des peptaïbols

Metabolites from marine derived *Trichoderma*: Identification, quantification and peptaïbols valuation in biocontrol

Résumé

Dans le cadre de la politique environnementale européenne, le plan Ecophyto vise la réduction de moitié de l'utilisation des pesticides d'ici 2018. Les solutions alternatives comme le biocontrôle qui utilise des mécanismes anti-phytopathogènes naturels provoqués par des organismes divers pour prévenir et lutter contre les maladies des végétaux cultivés sont privilégiées. Ainsi, l'utilisation de souches fongiques et notamment de *Trichoderma* d'origine terrestre est déjà développée en biocontrôle dans des préparations commerciales.

Le milieu marin étant riche en *Trichoderma* spp., le but de ce travail a été d'étudier l'intérêt potentiel de ces souches marines pour une utilisation en biocontrôle. Les *Trichoderma* produisent notamment des petits peptides à synthèse non ribosomale : les peptaïbols. Différents auteurs ont avancé l'hypothèse du rôle important qu'ils joueraient dans l'activité antifongique des *Trichoderma* qui les produisent. C'est la réponse à cette question et son application pour la sélection des souches utilisables en biocontrôle qui constitue la base de ce travail.

Les principaux axes de cette étude ont donc été l'identification de nouveaux peptaïbols, l'évaluation de leur activité antifongique sur des phytopathogènes ainsi que leur quantification dans les extraits de cultures de *Trichoderma* afin de développer des critères pour une sélection pertinente des meilleurs candidats pour une utilisation en biocontrôle. Aux cours de ces travaux, 2 nouvelles classes de peptaïbols ont été isolées et séquencées, l'action antifongique des peptaïbols longs a été démontrée *in vitro* et *in planta* et une méthode de quantification LC-MS a été développée et validée avec succès.

Mots clés

peptaïbols, biocontrôle, chromatographie liquide, spectrométrie de masse, quantification, *Trichoderma* marins

Abstract

Within the European environmental policy framework, the Ecophyto plan targets the half reduction of the pesticides use before 2018. Alternative ways such as the biocontrol that uses natural anti-pathogen mechanisms caused by various organisms are favored. Indeed, the use of fungal strains, particularly those belonging to the genus *Trichoderma* is already effective in biocontrol with various commercial preparations.

Since the marine environment is rich in *Trichoderma* spp., the aim of this work was to study the potential value of these marine strains for a use in biocontrol. The *Trichoderma* spp. produce numerous metabolites including small peptides with a non-ribosomal synthesis: peptaibols. Different authors have hypothesized the important role that these peptaibols play in the antifungal activity of *Trichoderma* strains which produce them. The answer to this question and its application for the selection of suitable biocontrol strains forms the basis of this work.

The main axes of this study were therefore research and the identification of new peptaibols, evaluation of their antifungal activity on phyto-pathogenic fungi affecting crop with a significant economic interest and their quantification in the extracts from *Trichoderma* cultures to develop criteria for an appropriate selection of the best candidates for biocontrol. In the course of this work, two new peptaibols classes have been isolated and sequenced, the antifungal action of long chain peptaibols has been demonstrated *in vitro* and *in planta* and a LC-MS method has been developed for their quantification and successfully validated.

Key Words

peptaibols, biocontrol, liquid chromatography, mass spectrometry, quantification, Marine derived *Trichoderma*