

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles :
substances toxiques de souches marines du genre
Trichoderma.

THÈSE DE DOCTORAT

ECOLE DOCTORALE CHIMIE BIOLOGIE
Mention Sciences de la Vie et de la Santé
Discipline Pharmacie
Spécialité Mycologie marine

Présentée et soutenue publiquement par

MOHAMED-BENKADA Mustapha

le 23 juin 2006, devant le jury ci-dessous :

<i>Président</i>	Monsieur VERITE Philippe , Professeur, Université de Rouen
<i>Rapporteurs</i>	Monsieur CRÈCHE Joël , Professeur, Université de Tours
	Monsieur RICHOME Pascal , Professeur, Université
<i>d'Angers</i>	
<i>Directeurs de thèse</i>	Madame MONTAGU Monique , Professeur, Université de Nantes
	Monsieur BIARD Jean-François , Professeur, Université de Nantes

SOMMAIRE

Liste des figures	2
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations.....	7
Introduction.....	8
CHAPITRE 1 Le premier chapitre de ce manuscrit présente les champignons marins, et plus précisément les <i>Trichoderma</i> sp.	10
1- la mycologie marine.....	12
2- définition et systématique.....	12
3- répartition géographique et biotope.....	13
4- relations Biologiques	14
5- Les champignons du genre <i>Trichoderma</i>	16
5-1 morphologie	17
5-2 taxonomie	18
5-3 ECOLOGIE	21
5-4 production de métabolites intéressants	22
Chapitre 2 les peptaïbols	24
1- rappel sur les mycotoxines	24
2- position des peptaïbols parmi les mycotoxines	25
3- Définition des peptaïbols	25
4- Modes de classement.....	26
5- origine biologique	28
6- STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE et caractéristiques chimiques DES PEPTAÏBOLS	28
6-1 hélice α (ou bien $3,6_{13}$).....	29
6-2 hélice 3_{10}	30
6-3 Feuilletés β et coudes β	30
7- La Biosynthèse des peptaïbols.....	31
8- LA BIOACTIVITE DES PEPTAÏBOLS	35
8-1 L'Étude du comportement membranaire des peptaïbols	37
8-2 Les canaux ioniques peptaïbols-induits.....	38
8-3 Facteurs régissant la formation et Le fonctionnement des CI peptaïbols	46
8-4 Spécificité ionique des canaux membranaires peptaïbols	49
8-5 Les peptaïbols et les autres toxines : synergie ?	50
CHAPITRE 3 MATERIEL ET METHODES1- obtention du matériel biologique	51
1- obtention du matériel biologique.....	52
1-1 Coordonnées géographiques des sites de prélèvements	52
1-2 technique de prélèvement, de transport et de conservation	52
1-3 mise en culture pour l'isolement de souches	70
1-4 isolement des souches	71
1-5 Conservation des souches.....	71
1-6 Identification taxonomique des souches par microscopie optique.....	73
1-7 identification taxonomique des <i>Trichoderma</i> sp. par la Méthode de J. Bissett	73
1-8 fermentation pour la production des peptaïbols.....	75
2- techniques de fractionnement	77
2-1 Chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	77
2-2 Chromatographie Liquide Basse Pression (VLC, vacuum liquid chromatography)	78
2-3 Chromatographie Liquide À Haute Performance (CLHP)	79
3- techniques d'identification structurale.....	83
3-1 La Spectrométrie de Masse (SM)	83
3-2 La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à impact électronique (CPG-SM-IE).....	91
CHAPITRE 4 PRODUCTION ET ISOLEMENT DES PEPTAIBOLS	98
1- Obtention du matériel biologique.....	98

1-1	Les sites de prélèvements	98
1-2	culture des souches a partir des prélèvements	99
1-3	isolement et identification des souches dU genre trichoderma productrices de peptaïbols.....	100
1-4	Conservation dans la Mycothèque et utilisation des souches	105
1-5	identification au niveau de l'Espece	105
2-	production de peptaïbols	106
2.1	optimisation du protocole de production de peptaïbols	108
2-3	validation de l'optimisation	112
2-4	bilan de l'optimisation.....	95
2-5	Protocole définitif de production de peptaïbols	95
2-6	selection de 4 souches représentatives des 9 trichoderma sp. initiaux	96
3-	Production massive des peptaïbols	98
4-	purification des peptaïbols par clhp analytique.....	98
4-1	Problèmes rencontrés en CLHP	99
4- 2	Solutions proposées et résultats	99
4-3	Protocole final adopté pour la CLHP.....	100
5-	purification des peptaïbols par clhp en mode préparatif.....	101
	Conclusion	103
	Chapitre 5-IdentificationStructurale des Peptaibols	103
1-	identification et sequençage des peptaïbols par spectrométrie de masse	104
1-1	Principe de séquençage des peptaïbols en SM.....	104
1-2	Cas des peptides contenant le résidu Proline.....	106
1-3	Le traitement acidolytique en SM.....	108
2-	isomérisation des acides aminés : resolution par cpg.....	109
3-	PROTOCOLE d'Identification structurale SUIVI DANS NOTRE étude	109
4-	resultats et discussion	113
4-1	l'analyse CPG	113
4-2	Résultats du séquençage esi-it-sm des peptaïbols des 4 «souches groupes»	114
	Conclusion	129
	CONCLUSION GENERALE	131
	Bibliographie.....	132
	Annexes	152

LISTE DES FIGURES

	Tome.Page
Figure 1 : Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichoderma Longibrachiatum</i> ...	I.10
Figure 2 : Les 5 sections systématiques de <i>Trichoderma</i> sp.....	I.16
Figure 3 : Ac ₂ tyl α dialkyl α amino acide (Ac-U)	I.19
Figure 4 : Organisation de la liaison peptidique et ses angles de torsion.....	I.22
Figure 5 : Sous unité d'une peptide synthétase.....	I.25
Figure 6 : Mécanisme de biosynthèse de peptaïbols par une peptide synthétase non ribosomique.....	I.27
Figure 7 : Formation d'un CI peptaïbol-induit selon le modèle de « douves de tonneaux ».....	I.33
Figure 8 : Polarité des monomères de peptaïbols et leur organisation dans les membranes phospholipidiques.....	I.33
Figure 9 : Organisation des hélices peptaïbols pour former un CI.....	II.33
Figure 10 : Action des peptaïbols sur la bicouche phospholipidique selon le modèle « en tapis ».....	I.35
Figure 11 : Modèle d'un canal octamérique de la trichotoxine.....	I.36
Figure 12 : Surface électrostatique d'un canal octamérique.....	II.37

Figure 13 : Aspect du CI conique et étranglé.....	II.37
Figure 14 : Structure 3D de l'alaméthicine.....	I.40
Figure 15 : Lieux de prélèvement autour de l'estuaire de la Loire (détaillée)	I.45
Figure 16 : Schéma de l'appareillage de la CLHP.....	I.56
Figure 17 : Applications de la ESI-SM en protéomique et chimie combinatoire	I.57
Figure 18 : Présentation du spectromètre de masse LCQ®.....	I.59
Figure 19 : Schéma d'une source ESI.....	I.60
Figure 20 : Schéma de l'ionisation par électronébulisation, cas de l'électrospray.....	I.61
Figure 21 : Les composants de base d'une trappe à ions.....	I.63
Figure 22 : Schéma de l'appareillage de la CG.....	I.65
Figure 23 : Schéma d'un injecteur capillaire pour CG (mode split/splitless)	I.65
Figure 24 : Schéma d'un analyseur quadripolaire.....	I.67
Figure 25 : Réaction de la formation des dérivés volatils d'AA.....	I.69
Figure 26 : Lieux de prélèvement autour de l'estuaire de la Loire (sommaire)	I.71
Figure 27 : Aspect macro (a) et microscopique (b) de la souche de <i>Trichoderma</i> MMS 408, 13 et 58.....	I.74
Figure 28 : Aspect macro (a) et microscopique (b) de la souche de <i>Trichoderma</i> MMS 43, 204 et 151.....	I.75
Figure 29 : Aspect macro (a) et microscopique (b) de la souche de	

<i>Trichoderma</i> MMS 147, 175 et 752.....	I.76
Figure 30 : Extraction des peptaïbols du milieu liquide.....	I.79
Figure 31 : Fermentation solide des peptaïbols - Mode opérateur.....	I.82
Figures 32 et 33 : Comparaison des spectres SM des extraits CH ₂ Cl ₂ issues de culture solide avec ceux de culture liquide	I.85 & 86
Figure 34 : Regroupement des 9 souches de <i>Trichoderma</i> sp. en 4 groupes.....	I.89
Figure 35 : Nomenclature de la fragmentation peptidique en SM.....	I.96
Figure 36 : Réaction de la formation des ions acyliums et ammoniums en SM.....	I.97
Figure 37 : Clivage préférentielle de la liaison U- P.....	I.98
Figures 38 à 44 : Chromatogrammes et spectres CPG-SM-IE des AA de référence.....	II.1
Figures 45 à 48 : Exemples de chromatogrammes et spectres CPG-SM-IE d'AA isomériques dans des peptaïbols identifiés.....	II.7
Figures 49 à 92 : Spectres détaillés du séquençage MS ⁿ des nouveaux peptaïbols.....	II.12

LISTE DES TABLEAUX

Tome.Page

Tableau 1 : Les 9 sous familles de peptaïbols.....	I.20
Tableau 2 : L'alaméthicine et ses analogues structuraux.....	I.28
Tableau 3 : Conditions SM utilisées pour l'analyse des peptaïbols.....	I.64
Tableau 4 : Code MMS, espèces et sections, lieu et origine des prélèvements des souches étudiées.....	I.78
Tableau 5 : Répartition des masses moyennes et présence des peptaïbols dans les fractions VLC.....	I.83
Tableau 6 : Masses des extraits CH ₂ Cl ₂ et des fractions VLC 10% produites par les 4 « souches groupes ».....	I.90
Tableau 7 : Masses des résidus AA (monoisotopiques et moyennes) contenus dans les peptaïbols.....	I.102
Tableau 8 : Résultats de l'analyse CPG-IE-SM des AA isomériques des peptaïbols des 4 « souches groupes ».....	I.103
Tableau 9 : Séquences, masses moléculaires, masse des adduits Na, des ions bichargés, noms et analogie des peptaïbols identifiés chez la souche MMS 147.....	II.12
Tableau 10 : Classement des peptaïbols des 4 souches marines de <i>Trichoderma</i> sp. en type et leur analogie avec les molécules connues.....	I.106

Tableau 11 : Sites des AA constants des peptaïbols de la souche MMS
147.....**I.107**

Tableau 12 : Séquences, masses moléculaires, masse des adduits Na, des ions
bichargés, noms et analogie des peptaïbols longs identifiés chez la souche MMS
151.....**II.20**

Tableau 13 : Sites des AA constants des peptaïbols longs de la souche MMS
151.....**I.110**

Tableau 14: Séquences, masses moléculaires, masse des adduits Na, des ions
bichargés, noms et analogie des peptaïbols courts identifiés chez la souche MMS
151.....**II.36**

Tableau 15 : Sites des AA constants des peptaïbols courts de la souche MMS
151.....**I.112**

Tableau 16 : Séquences, masses moléculaires, masse des adduits Na, des ions
bichargés, noms et analogie des peptaïbols identifiés chez la souche MMS
175.....**II.39**

Tableau 17 : Sites des AA constants des peptaïbols de la souche MMS
175.....**I.114**

Tableau 18 : Séquences, masses moléculaires, masse des adduits Na, des ions
bichargés, noms et analogie des peptaïbols identifiés chez la souche MMS
204.....**II.54**

Tableau 19 : Sites des AA constants des peptaïbols de la souche MMS
204.....**I.116**

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide(s) aminé(s)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
AcOEt	Acétate d'éthyle
ATP	Adénosine tri phosphate
CH₃CN	Acétonitrile
CPG-SM-EI	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à impact électronique
CCM	Chromatographie sur couche mince
CLBP	Chromatographie liquide basse pression
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
Da	Daltons
ESI-MSⁿ	Electo spray ionisation couplée à la spectrométrie de masse par piégeage successif d'ions
EtOH	Ethanol
IFREMER	Institut français de la recherche sur la mer
IT	Ion trappe
ITS	Internal transcribed spacer
MM	Masse moléculaire
MeOH	Méthanol
MMS	Mycothèque marine du SMAB
NRPS	Non ribosomal peptide synthetases
PCR	Polymerase chain reaction
REMY	Réseau de surveillance de microorganismes
REPHY	Réseau de surveillance de phytoplancton et phycotoxines
SM	Spectrométrie de masse
SMAB	Substances marines à activité biologique
TFA	Acide trifluoroacétique
TFAA	Acide trifluoroacétique anhydre
Th	Thomson
t_R	Temps de rétention
UV	Ultra Violet

Introduction

Ce travail est consacré à l'étude chimique des peptaïbols secrétés par les souches de *Trichoderma* sp. endémiques des zones conchylicoles de Loire-Atlantique (France). Ce sujet entre dans le cadre de l'une des thématiques du groupe SMAB (Substances Marines à Activité Biologique), débuté en 1995 et dédié à l'étude de l'impact potentiel des toxines fongiques d'origine marine sur la salubrité sanitaire des coquillages alimentaires.

Selon le Comité National français de la Conchyliculture (CNC), cette filière est l'une des plus importantes au monde (200 000 tonnes en 1999, 655 millions d'euros de chiffre d'affaires, 5 500 entreprises, 7 000 exploitants et plus de 20 000 emplois). Son taux de production fait de la France le principal producteur d'huîtres en Europe (65,5 % de la production) (Solliec, 2004 ; http://www.coquillages.com/home_setH.htm) et la classe au cinquième rang mondial (après la Chine, les USA, le Japon et la Corée).

Localement, les parcs conchylicoles de la Loire-Atlantique, avec une production estimée à 15 000 tonnes d'huîtres par an, sont d'une importance économique considérable pour la région.

L'importance de ce secteur incita l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) à mettre sur pied un service chargé de la surveillance de la qualité des coquillages alimentaires sur le littoral français par rapport aux toxines de microalgues. Le test, développé sur Souris, recherche les effets toxiques des extraits de coquillages échantillonnés périodiquement des zones aquacoles. Les lots présentant des anomalies dans ce sens sont systématiquement interdits au commerce.

C'est lors de ces contrôles que les réseaux REPHY et REMI de l'IFREMER ont noté à plusieurs reprises une toxicité inexpiquée dans des extraits de coquillages en provenance du Pertuis Breton (novembre, 1992), de l'étang de Salses de Leucate (mai 1993 et 1994), de la rade de Toulon (mars, novembre 1993 ; mai, 1994), de la Baie d'Arcachon (janvier, 1994), de la Trinité (mai, 1994) et de la Normandie (juillet, 1994) (Amzil *et al.*, 1996). Ajoutés à cela, des épisodes de mortalité massive de coques, là encore sans cause identifiée, ont été enregistrés en 1997 et 1998 au Croisic (Landreau, 2001). Enfin, les responsables de certains parcs français constatent une plus faible croissance et une mortalité importante des coquillages ces dernières années (De Vasson, 2002).

Sur la côte Est du Canada en 1987, la consommation de moules en provenance des parcs conchylicoles de l'île du Prince Edward, causa 108 cas d'intoxication alimentaire et 3 décès. Plusieurs pistes ont été suivies pour tenter d'élucider l'origine de cette toxicité (Brewer *et al.*, 1993) mais en vain. Les analyses effectuées sur des prélèvements de zones touchées (en France et au Canada) ont prouvé, notamment, l'absence de phytoplancton, de bactéries toxigènes, de phycotoxines et de contaminants chimiques (métaux lourds, hydrocarbures...).

A partir de ces éléments, le SMAB avança l'hypothèse de l'implication des micromycètes dans ces phénomènes de toxicité et ce fut le point de départ du projet de recherche « Alimentation et Santé ». Les grandes lignes de ce projet visaient à répondre aux questions suivantes :

- existe-t-il des champignons dans les zones conchylicoles ?
- produisent-ils des toxines ?
- ces toxines contaminent-elles les coquillages ?
- cette contamination est-elle dangereuse pour
 - les coquillages ?
 - les consommateurs ?

Le projet a été inauguré par la thèse de Sallenave (1999), qui a montré la présence de toute une microfonge dans les zones aquacoles étudiées (Le Croisic, La Baule, Tharon, Port-Giraud, La Tara, La Prée), avec la prédominance respective des genres *Penicillium* (47%), *Trichoderma* (10%), *Cladosporium* (6%) et *Aspergillus* (5 %). Certaines des souches fongiques isolées produisent des substances toxiques, surtout celles du genre *Trichoderma* et *Penicillium* (toxicité sur larves de diptères et d'*Artemia salina*, hémolyse d'érythrocytes de mouton).

Les travaux suivants ont ciblé la nature chimique de ces molécules fongiques bioactives. Landreau (2001) a identifié des peptaïbols chez une souche de *Trichoderma koningii* et Grovel (2002) de la gliotoxine chez une souche d'*Aspergillus fumigatus*.

Depuis, des résultats nouveaux, non publiés, ont montré la présence de peptaïbols dans les sédiments des zones aquacoles, prouvant que la contamination existe bien (point 3 ci-dessus), et pourrait être liée aux toxicités observées, sachant que les peptaïbols sont remarquables pour, entre autres, la diversité de leur bioactivité (souvent létale) vis-à-vis des organismes eucaryotes. Il serait alors intéressant de connaître les effets aigus ou chroniques

de ces peptides, produits dans les zones aquacoles, sur la santé des coquillages et potentiellement sur celle des consommateurs des produits de l'estran, principalement l'Homme.

Ainsi, l'identification des peptaïbols les plus fréquemment rencontrés (idéalement tous les peptaïbols présents) dans l'estuaire de la Loire devenait nécessaire, et représente l'essentiel du présent travail. La stratégie proposée pour le réaliser a été la suivante :

- Echantillonner des souches de *Trichoderma* sp., productrices de peptaïbols, en provenance des zones aquacoles, et représentatives de ce genre parmi la microfonge de l'estuaire de la Loire
- Mettre au point les protocoles nécessaires à la production *in vitro* des peptaïbols
- Optimiser les conditions de purification et d'identification structurale des peptaïbols.

Plan de thèse :

CHAPITRE 1 LE PREMIER CHAPITRE DE CE MANUSCRIT PRÉSENTE LES CHAMPIGNONS MARINS, ET PLUS PRÉCISÉMENT LES *TRICHODERMA* SP.

Le second chapitre est consacré au bilan des connaissances actuelles sur les peptaïbols. Une analyse bibliographique définit et traite les caractères structuraux, la biosynthèse, ainsi que la bioactivité de ces peptides particuliers.

Le troisième chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisées pour l'obtention du matériel biologique source de peptaïbols ainsi que les techniques de fractionnement et d'identification structurale des peptaïbols.

L'étude de la production et de l'isolement des peptaïbols par les souches choisies fait l'objet du quatrième chapitre.

Le dernier chapitre relate l'identification structurale des peptaïbols isolés et présente les résultats obtenus et leur discussion.

1- LA MYCOLOGIE MARINE

L'histoire de la mycologie marine commence par trois faits majeurs :

- La description par Desmazières en 1849 de la première espèce de champignon isolé du milieu marin, *Phaeosphira typharum*,
- la découverte des botanistes français Durieu de Maisonneuve et Montagne en 1869 du premier champignon strictement marin, *Halottia posidoniae* (à l'origine *Sphaeria oceanica*),
- et l'isolement de levures à partir de la mer par Fischer puis Brebeck en 1894 (Brisou, 1975).

Cependant, cette discipline n'a pris son véritable essor qu'en 1944, suite à la publication par Barghoorn et Linder d'un document de référence intitulé : « *Marine fungi, their taxonomy and biology* » qui traite de plusieurs espèces fongiques présentes sur le bois en milieu marin (Kohlmeyer, 1983 ; Gareth-Jones, 1998 ; Vishwakiran *et al.*, 2001). Depuis, ont été identifiées des centaines d'espèces de micromycètes d'origine marine stricte ou facultative.

2- DÉFINITION ET SYSTÉMATIQUE

Comme tous les micromycètes, les champignons marins sont des organismes microscopiques eucaryotes pluricellulaires. La taxonomie les situe entre les végétaux et les animaux. Ils sont hétérotrophes pour la matière organique, qu'ils se procurent à partir d'autres organismes via d'importants dispositifs enzymatiques. Leur mode de reproduction est sexué et/ou asexué. La colonie fongique née à partir d'une spore, qui émet un bourgeon germinatif, se développe en hyphe (structure cellulaire tubulaire siphonnée ou cloisonnée). Cet hyphe se multiplie en un important réseau enchevêtré d'autres hyphes : le mycélium, d'apparence très variable et qui envahit le substrat par zones concentriques.

Les champignons de la mer sont définis selon leurs besoins environnementaux et physiologiques. La définition en vigueur est celle de Kohlmeyer et Kohlmeyer (1979). Elle

stipule que « les champignons marins obligatoires sont ceux qui ne peuvent croître et sporuler qu'exclusivement en milieu marin et estuarien. Les champignons marins facultatifs sont ceux provenant de milieux aquatiques et terrestres, capables de se développer, et probablement de sporuler, dans le milieu marin » (Fenical et Jensen, 1997).

Bien que la plupart des groupes soient représentés, les Ascomycètes (Ascomycotina, spores produites dans des sacs, les asques ; la germination des ascospores donne des filaments cloisonnés) et les champignons mitosporiques (anciennement les deutéromycètes, reproduction sexuée inconnue) sont les plus largement présents. Leur prédominance est probablement due à leur capacité à produire une large palette d'enzymes lignocellulolytiques entraînant la pourriture lente de la matière ligneuse en mer, et dont les basidiomycètes sont démunis (Gareth-Jones, 1998 ; Sridhar and Prasannarai, 2001).

D'après Khudyakova *et al.* (2000), 98 % des espèces fongiques trouvées dans le milieu marin sont marines facultatives, représentées surtout par les genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Wardomyces*, *Chrysosporium* et *Chaetonium*.

Objet de controverse (Miller, 1994 ; Gareth-Jones *et al.*, 2001), le nombre d'espèces de champignons filamenteux marins est estimé par Kohlmeyer et Kohlmeyer (1979) à 500. Schaumann (1993) avance le nombre de 6000 espèces, alors que Gareth-Jones (1997) le limite à 1500. Toujours est-il que ces chiffres sont révisés par la découverte régulière de nouvelles espèces, et selon que les auteurs considèrent ou non les levures et les Phycomycètes (champignons caractérisés par un thalle à hyphes non cloisonnés) (Liberra et Lindequist, 1995). Cependant, la plupart des espèces fongiques marines (comme celles des profondeurs ou celles qui colonisent les algues tropicales) attendent encore d'être décrites (Gareth-Jones, 1998).

3- RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE ET BIOTOPE

La biogéographie de la microfonge marine dépend largement de (Kohlmeyer, 1983 ; Cuomo *et al.*, 1995 ; Hyde *et al.*, 1998) :

- La température
- La salinité

- La teneur en éléments nutritifs
- La pression hydrostatique
- La concentration d'oxygène

Présents dans toutes les mers et océans, les micromycètes marins sont répartis sur le littoral, les plages sablonneuses, mangroves et les eaux profondes, même dans les profondeurs abyssales à plus de -5000 m (Kohlmeyer, 1977 ; Brisou, 1975 ; Pang *et al.*, 2004). La microfonge marine des grandes profondeurs reste de ce fait très peu connue (Liberra et Lindequist, 1995 ; Vishwakiran *et al.*, 2001).

Transportées par des supports inertes ou vivants sur lesquelles elles s'adsorbent, les spores fongiques sont véhiculées par les courants marins (Brisou, 1975) et atteignent les 5 zones mycogéographiques marines à travers le globe terrestre : arctique, tempérée, subtropicale, tropicale et antarctique (Kohlmeyer, 1983).

Leurs répartition et fréquence restent plus constantes au niveau des sédiments, sur le plancton côtier et de haute mer, dans les mollusques et intestins de poissons (Brisou, 1975).

Beaucoup de micromycètes marins vivent sur des algues, bois, feuilles et autres corps organiques végétaux et animaux en décomposition, boues, sable et corail (Hyde *et al.*, 1998).

Ils sont également présents sur des mollusques, coquillages, crabes et éponges ainsi que dans le tractus gastro-intestinal de poissons et certaines espèces sont d'importants pathogènes en milieu marin. D'autre, comme *Schizochytrium aggregatum*, sont de plus des réservoirs naturels de virus pathogènes qu'ils transmettent ainsi à leurs hôtes (Sollic, 2004). D'autres espèces forment des lichens avec des algues marines sur les rochers côtiers, alors que certaines sont libres et flottent dans le plancton (Endomycètes).

4- RELATIONS BIOLOGIQUES

Les champignons marins (organismes hétérotrophes) vivent aux dépens de substrats organiques, dont ils tirent l'énergie grâce à un arsenal d'enzymes tout comme leurs homologues terrestres (Liberra et Lindequist, 1995).

On leur connaît des interactions avec les algues marines, les plantes vasculaires, les invertébrés, les poissons et les mammifères (Stanley, 1992). Les relations biologiques des champignons marins avec le monde vivant sont de plusieurs types :

Saprotrophes ; Ils sont activement responsables de la dégradation des substrats ligneux marins riches en lignocelluloses (cellulose, hémicellulose et lignine) (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1995). Ils contribuent également à la dégradation des cadavres animaux marins (Sridhar et Prasannarai, 2001).

Parasites ; Les mycoses ont un impact important dans l'environnement marin et agissent comme un facteur naturel limitant de plantes aquatiques, d'algues et d'animaux (intestins de poissons et Crustacés). Ils provoquent de sérieuses infections chez les invertébrés marins, et affectent le développement des œufs et des larves de Crustacés. Les champignons mitosporiques sont les mycopathogènes marins les plus fréquents (*Fusarium* sp. chez les Crustacés, *Cladosporium* sp. chez le poulpe, *Phialospora* sp. infections internes chez les poissons, *Ichthyophonus* sp. inflammation par enkystement des muscles de poissons) (Polglase *et al.*, 1986).

Symbiotes ; Forment un lichen (ex. *Chadefaudia corallinarum* s'associe avec l'algue *Dermatoliton* sp.) ou une mycophycobiose (relation d'intérêt mutuel entre un champignon et une macroalgue) démontrée par la relation obligatoire et protectrice pour l'algue entre *Turgidosculum complicatum* et la macroalgue *Praseola borealis* (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979 ; Stanley, 1992 ; Hyde *et al.*, 1998).

Les champignons marins représentent un maillon important dans les chaînes alimentaires de l'écosystème marin et sont eux-mêmes une source de nourriture pour d'autres organismes marins. Ils colonisent et forment des structures communautaires sur les substrats vivants et morts, submergés dans la mer (Hughes, 1975 ; Cuomo *et al.*, 1995 ; Liberra et Lindequist, 1995).

Par ailleurs, la survie de ces micromycètes dans le monde marin, face à la rude compétition avec d'autres organismes, dépend entièrement de la production de métabolites secondaires. La dominance de certains genres sur certains substrats marins s'explique par leur production de molécules fortement bioactives, comme c'est le cas de *Corollospora maritima* et *Halocyphina villosa* (Cuomo *et al.*, 1995 ; Liberra et Lindequist, 1995). 57% des espèces isolées de la Mer du Japon se sont montrées bioactives (hémolytiques), notamment des souches de *Trichoderma* sp. et d'*Aspergillus* sp. (Khudyakova *et al.*, 2000). Les

champignons du genre *Trichoderma* se sont également montrés neurotoxiques vis-à-vis de larves de diptères (Sallenave, 1999). Ce phénomène est à l'origine de la présente étude.

5- LES CHAMPIGNONS DU GENRE *TRICHODERMA*

Le terme « *Trichoderma* » a été introduit dans la mycologie en 1794 par Persoon (Roussos, 1985 ; Bissett, 1991a). Il désigne des champignons microscopiques considérés durant 200 ans comme étant des «Gastéromycètes». Ces organismes cosmopolites appartiennent à un grand ensemble de champignons sans reproduction sexuée connue (Vining, 1990 ; Genilloud *et al.*, 1994 ; Fujita *et al.*, 1994 ; Roquebert, 1996).

En milieu terrestre, leur production d'enzymes, de substances bioactives et leur développement rapide font des *Trichoderma* sp. des agents potentiels en agro-alimentaire et une matière de choix pour l'exploitation industrielle (Prieto *et al.*, 1997). Quelques-unes des quelques 35 espèces établies à ce jour sont d'intérêt économique, pour leur production d'enzymes cellulolytiques et utilisés comme agents de lutte biologique en raison de leur antagonisme vis-à-vis d'autres espèces fongiques (antibiose, mycoparasitisme, compétition, lyse, promotion de la plante hôte) (Fujita *et al.*, 1994 ; Schirmböck *et al.*, 1994 ; Roquebert, 1996 ; Cooney *et al.*, 1997 ; Prieto *et al.*, 1997 ; Grondona *et al.*, 1997 ; Verbist, 2000 ; Kubicek *et al.*, 2003).

Les *Trichoderma* sp. peuvent être responsables d'infections chez les patients immunodéprimés, bien que l'Homme ne leur soit qu'un hôte accessoire (Roquebert, 1996). Sous certaines conditions, ils peuvent provoquer chez lui des infections opportunistes fatales (Munoz *et al.*, 1997). Il a été constaté que le développement des *Trichoderma* sp. chez l'Homme est souvent le fait de déficits immunitaires spontanés ou post-thérapeutiques, qui en favorise la survenue et en augmente la gravité (Ragnaud *et al.*, 1984). Ces affections invasives ou localisées peuvent engendrer des :

- mycétones (tumeurs inflammatoires) pulmonaires,
- péritonites (Tanis *et al.*, 1995),
- hématomes péri-hépatiques,
- abcès cérébraux (Seguin *et al.*, 1995),
- kératites fongiques,
- septicémie,

- infections épidermiques et subcutanées localisées,
- infections pré-trachéales, du muscle cardiaque et de l'estomac (Gutiérrez *et al.*, 1995).

Le traitement de ces mycoses est souvent chirurgical suivi de thérapie antifongique, mais les cas de décès sont fréquents (Munoz *et al.*, 1997).

5-1 morphologie

L'aspect macroscopique des *Trichoderma* sp. est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées, réparties en boîtes de Pétri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides.

Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogenèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16^{ème} et le 20^{ème} jour un feutrage épais se superpose à la culture.

Au microscope optique on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores (Fig. 1) ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies) (Cournut, 1984 ; Landreau, 2001, Kubicek *et al.*, 2003).

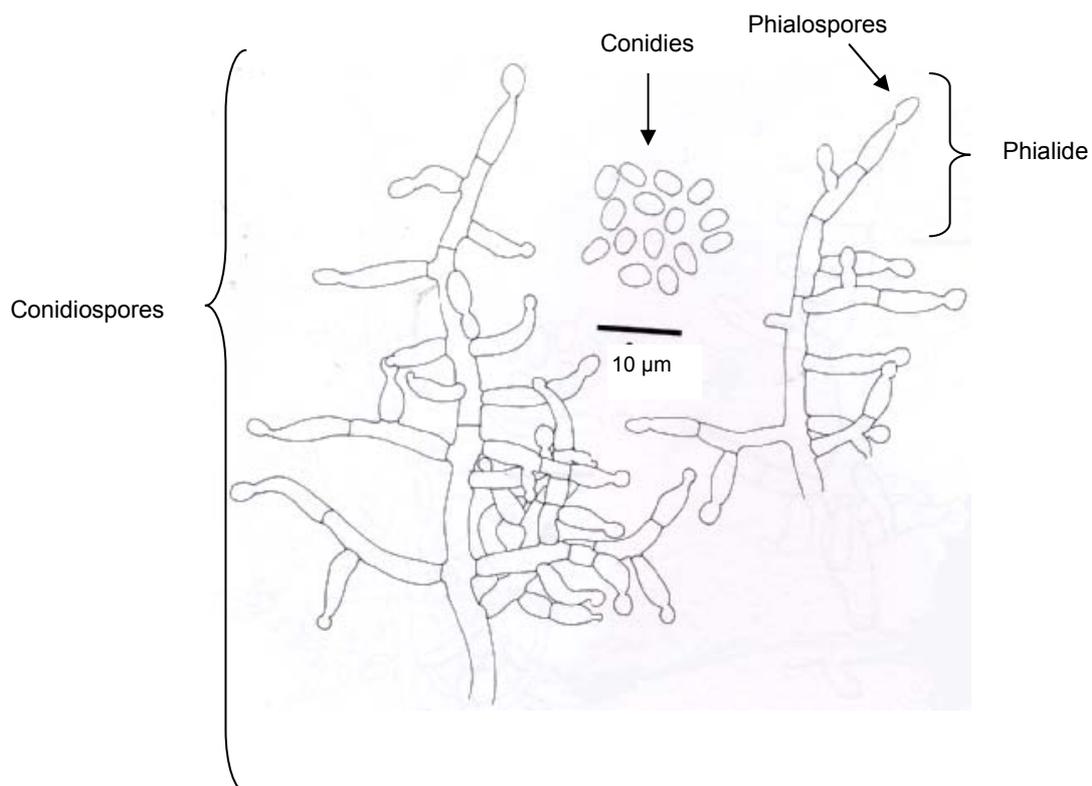


Fig.1 : Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma longibrachiatum* (Samuels et al., 1994).

5-2 taxonomie

La division du genre *Trichoderma* en espèces a fait l'objet de nombreuses études et de beaucoup de polémiques. Dans le règne vivant les limites de «l'espèce» reposent sur la possibilité de croisement entre individus. Or, les champignons anamorphes du

genre *Trichoderma*, en tant que tels, n'ont pas de reproduction sexuée connue, et ce caractère ne peut donc être utilisé pour leur systématique. On se base alors sur les aspects culturels et la morphologie des appareils sporogènes (Roquebert, 1996) ainsi que sur le matériel génétique en s'appuyant sur des techniques de biologie moléculaires (Gams et Bissett, 1998).

Si on répertorie succinctement les dates les plus importantes qui ont marqué la systématique des *Trichoderma* sp., on se rend vite compte que leur positionnement taxonomique n'a pas été chose facile.

En 1794, Persoon décrit le premier *Trichoderma* sp. et établit 4 espèces.

En 1821, Fries classe les *Trichoderma* sp. parmi les Gastéromycètes.

En 1860, débutent les controverses sur cette systématique, Tulasne contredit Fries puisqu'il ne trouve pas de forme téléomorphes (sexuées) à ce genre.

En 1871, devant le nombre croissant d'espèces rencontrées, Harz insiste sur l'importance des caractères morphologiques sous microscopie optique (surtout les phialides).

En 1916, Waksman décrit ce qu'il trouve être 6 nouvelles souches de *Trichoderma* sp. en utilisant des critères macroscopiques, différents de ceux préconisés par Harz.

En 1926, Abbot identifie 4 espèces de *Trichoderma* selon des critères une fois de plus différents des précédents.

Jusqu'à 1939 le raisonnement d'Abbot reste en vigueur, mais aussi à côté d'identifications totalement indépendantes.

En 1939, Bisby tente de mettre de l'ordre dans ces systèmes en proposant une unique espèce : *Trichoderma viridae*. Et durant 24 ans, toute espèce fongique à spores vertes était considérée comme étant un *Trichoderma* sp.

En 1963, les travaux de Gutter et Monbasher mettent fin au système précédant, en démontrant la variabilité des espèces de *Trichoderma* en fonction des conditions environnementales.

En 1969, conscient de toute cette polémique, Rifai propose une classification « utilisable avec le concept d'« espèces agrégées », basé sur les caractères microscopiques. « Une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'espèces très similaires, difficiles à séparer ». Neuf espèces agrégées sont créées (*T. aureoviridae* Rifai, *T. hamatum* Bain, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudemans, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Webster et Rifai, *T. polysporum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai et *T. viridae* Gray), tout en tolérant une certaine variabilité au sein de chaque espèce agrégée (Rifai, 1969).

En comparaison avec les nombreux précédents, ce système semble le plus facilement utilisable pour la communauté scientifique, d'autant plus qu'il a été amélioré récemment par Bissett (1984, 1991a et b).

En 1991, Bissett propose la notion de « section » pour faire face au nombre croissant d'espèces nouvelles de *Trichoderma* sp., sans rapport avec les espèces agrégées.

Se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides, il regroupe les espèces agrégées dans 5 sections (Fig. 2) (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocrea*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*) (Leuchtman, 1996 ; Landreau, 2001).

Le système taxonomique de Bissett est aussi appuyé, entre autres, par des approches de biologie moléculaire (PCR), pour répondre au positionnement de nouvelles espèces de *Trichoderma* identifiées (dont les formes téléomorphes¹ sont souvent non identifiées) et reste le plus fiable actuellement (Lillard-Roberts, 2004). La méthodologie de cette taxonomie, détaillée dans le chapitre 3 paragraphes 1-6 et 1-7, repose sur des comparaisons de l'aspect morphologique, le profil métabolique, l'examen phylogénétique et la séquence d'ADN avec des bases de données de références internes au laboratoire de Bissett (Canada).

Les espèces de *Trichoderma* ainsi que leurs rares formes téléomorphes observées sont classées parmi les Ascomycètes (second plus important groupe fongique en nombre d'espèces) du genre *Hypocrea* (Sugiyama, 1987 ; Kubicek *et al.*, 2003).

Plus de 200 espèces du genre *Hypocrea* ont été identifiées, mais sont rarement cultivables, et de ce fait peu décrites en termes modernes (<http://nt.arsgrin.gov/taxadescriptions/keys/Genusoverview.cfm>). Sous certaines conditions, méconnues, les *Hypocrea* sp. (téléomorphes) se transforment « définitivement » en *Trichoderma* sp. (anamorphes). On pense alors que l'évolution a conduit à la disparition du mode sexué pour l'établissement d'un genre à reproduction exclusivement asexuée (Roquebert, 1996).

La biologie moléculaire nous révèle aujourd'hui que des espèces de *Trichoderma* génétiquement différentes, présentent des similitudes morphologiques spectaculaires et leurs caractéristiques se chevauchent ce qui, d'une part explique la longue controverse connue par ce genre auparavant et d'une autre part, montre que les seuls critères morphologiques ne suffisent plus pour une classification incontestable et rigoureuse des formes anamorphes de *Trichoderma* sp. (Cournut, 1984 ; Sugiyama, 1987).

¹ Le cycle biologique (holomorpe fongique) de certaines espèces fongiques comprend un stade **sexué (teleomorphe)** et un autre **asexué (anamorphe)**. Proposé par Fuckel (1870) et reprise par Weresub et Hennebert (1979), cette terminologie a fini par être reconnue par « The international Code of Botanical Nomenclature » (I.C.B.N.). Ce phénomène biologique s'applique aux *Trichoderma* sp. (Gams & Bissett, 1998 ; Esser et Lemke, 2001 ; <http://nt.arsgrin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>).

La taxonomie moderne des champignons a aboli l'embranchement des Deuteromycotina², auquel appartenait le genre *Trichoderma*. La position taxonomique actuelle des *Trichoderma* sp. se présente comme suit (selon Bissett, 2004) :

▪ Embranchement	Amastigomycota et/ou Eumycètes
▪ Sous embranchement	Ascomycotina
▪ Classe	Sordariomycètes
▪ Ordre	Hypocréales
▪ Famille	<i>Hypocraceae</i>
▪ Genre	<i>Hypocrea</i> mitosporique** (<i>Trichoderma</i>)

**Groupe important de champignons hétérogènes ayant pour caractéristique commune l'absence de stade sexué (http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html).

5-3 ECOLOGIE

Grâce à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature, aussi bien en milieu terrestre que marin (Roquebert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998).

En effet, les *Trichoderma* sp. sont remarquables pour leur croissance rapide et leur capacité à utiliser différents substrats et sont, par conséquent, l'élément majeur dans la mycoflore terrestre et marine (Widden et Abitrol, 1980 ; Kubicek *et al.*, 2003).

Les *Trichoderma* sp. terrestres se développent quasiment dans tous les sols (forestiers ou cultivés) et sur les végétaux en décomposition. Ils contaminent fréquemment le compost de la culture industrielle des champignons comestibles, mais sont rarement parasites de plantes vivantes (Roquebert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998).

Dans la mer, les *Trichoderma* sp. sont marins facultatifs (Kohlmeyer *et al.*, 1979 ; Liberra et Lindequist, 1995). D'après l'étude de Shaumann (1993) sur la microfonge marine des profondeurs de la Mer du Nord et de l'Atlantique Nord, les *Trichoderma* sp. y ont été

² Les **Deuteromycotina** (Champignons imparfaits) constituaient une division dans les schémas de classification antérieurs. Ils regroupaient les formes dépourvues de reproduction sexuée (reproduction uniquement par voie végétative) et **ne sont plus reconnus** en tant que division autonome. On place maintenant les formes asexuées dans les divisions auxquelles appartiennent leurs phases sexuées (soit Ascomycotina ou Basidiomycotina). Si on ignore (pour le moment) à laquelle de ces divisions appartient leur forme sexuée, deux cas de figure se présentent :

1) soit les données biochimiques ou moléculaires permettent d'attribuer ces champignons imparfaits à l'un ou l'autre de ces groupes ;
2) soit on les conserve provisoirement dans un ensemble artificiel (sans valeur hiérarchique dans la systématique) « dénommé ensemble des champignons mitosporiques » (<http://www2.ac-lille.fr/myconord/Page02.htm> ; Bouchet *et al.*, 2005).

identifiés à tous les niveaux. Ils ont été également isolés à partir d'algues marines (*Rhodophyta* sp. et *Phaeophyta* sp.) prélevées de la côte atlantique et méditerranéenne ibériques (Genilloud *et al.*, 1994) ainsi qu'à partir de moules au Canada (Brewer *et al.*, 1993).

Leur présence dans le tractus digestif et la surface de plusieurs espèces de « concombre des mers » (*Holothurioidea* sp., *Echinodermata* sp.) reste insolite, puisque ces derniers biosynthétisent des glycosides triterpéniques aux fortes activités antifongiques et cytotoxiques (Pivkin, 2000).

L'inventaire des souches fongiques marines du littoral atlantique effectué par Sallenave-Namont (2000) montre que le genre *Trichoderma* est l'un des 3 prédominants. Il vient à la 3^{ème} position après les genres *Penicillium* et *Aspergillus* en importance numérique. La présence des *Trichoderma* sp. en milieu terrestre (6% du nombre total des espèces fongiques) semble comparable à celle en milieu marin (6,4% à 10,4%) (Landreau, 2001).

L'abondance des *Trichoderma* sp. dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes. Ils sont de ce fait un maillon important dans les chaînes biologiques (Widden et Abitrol, 1980 ; Vining, 1990 ; Kubicek *et al.*, 2003).

5-4 production de métabolites intéressants

La mise en évidence de la production de métabolites secondaires par les *Trichoderma* sp. a été rapportée pour la première fois par Weidling (1934), concernant un antifongique (Papavizas, 1985). Depuis, les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Vizcaino *et al.*, 2005), processus régi par des interactions biochimiques extrêmement complexes et parfaitement coordonnées (Vining, 1990).

La littérature cite que les métabolites importants de *Trichoderma* sp. sont principalement des enzymes et des molécules bioactives. Le travail de thèse de Landreau (2001) ayant présenté une synthèse bibliographique sur ces groupes de produits, nous ne les citons ici que très succinctement :

5-4-1 Production d'enzymes

La production des enzymes est variable d'une souche à l'autre. Principalement les xylanases ou les cellulases (Sandgren *et al.*, 2005), exploités dans divers domaines biotechnologiques (Kubicek *et al.*, 2003).

5-4-2 Production de substances bioactives

- Métabolites volatils : 6 pentyl α pyrone, éthylène, cyanure d'hydrogène, alcools, aldéhydes (Vizcaino *et al.*, 2005)
- Métabolites non volatils diffusibles : polyacétates (antifongiques, antibiotiques), trichotécènes (variété de toxines actives sur microorganismes et mammifères) notamment les trichodermines (Blumenthal, 2004).
- Métabolites polypeptidiques ; ciclosporines (immunosuppresseurs, anti-inflammatoire) et les **peptaïbols** (Landreau, 2001) auxquels est consacré le chapitre 2 de cette thèse.

CHAPITRE 2 LES PEPTAÏBOLS

En raison de leurs caractéristiques chimiques et biologiques, les peptaïbols sont généralement assimilés à des mycotoxines peptidiques. Pour mieux les définir, nous entamerons ce chapitre par un rappel général sur les mycotoxines.

1- RAPPEL SUR LES MYCOTOXINES

Les mycotoxines sont des molécules de structures chimiques très diverses issues du métabolisme secondaire³ de la plupart des champignons (même en culture *in vitro*), souvent excrétés dans le milieu environnant (Frisvad, 1990 ; Demain & Fang, 2000 ; Miller, 2000).

Leur production dépend de conditions environnementales régissant des facteurs intrinsèques et extrinsèques (composition des substrats naturels, température, pH, taux d'O₂ et de CO₂, compétitivité microbienne...) (Frisvad et Samsom, 1991).

Certaines mycotoxines jouent le rôle de signaux internes pour la différenciation cellulaire (ex. la sporulation) (Vining, 1990), mais elles sont plus remarquées pour leur bioactivité. Plus de 40% de ces toxines fongiques induisent de puissants et nombreux effets biologiques aigus ou chroniques. Certaines sont cancérigènes (ex. ochratoxines), mutagènes (ex. aflatoxines), hémorragiques, dermatotoxiques (ex. trichotécènes), neurotoxiques (ex. parixilline), cytotoxiques ou antimicrobiennes.

On appelle mycotoxicose une intoxication humaine ou animale causée par l'absorption de mycotoxines dont l'impact dépend de la nature et de la quantité consommée (Subramanian, 1983 ; Steyn, 1995 ; Soliman et Badeaa, 2002).

Dans certaines conditions, leur production est décisive pour l'existence des organismes producteurs, inhibant le métabolisme primaire d'autres espèces compétitives et antagonistes (animales, végétales ou microbiennes) dans leur écosystème afin d'y conforter leur présence (Frisvad, 1990 ; Demain & Fang, 2000 ; Miller, 2000).

³ Les métabolites secondaires n'ont pas de fonctions métaboliques essentielles, et sont synthétisés secondairement par des voies biosynthétiques hautement endergoniques des cellules animales, végétales ou microbiennes. Ce sont des molécules caractérisés par des structures chimiques très diversifiées, complexes, et inhabituelles. Ils sont souvent spécifiques aux organismes producteurs, parfois même à une seule espèce. Les clusters qui codent leur synthèse ne contiennent que des gènes fonctionnels et sont localisés parmi ceux de résistance et de régulation, ce qui montre leur importance pour la cellule productrice (Miller, 2000).

2- POSITION DES PEPTAÏBOLS PARMIS LES MYCOTOXINES

Les peptaïbols font partie des mycopeptides qui sont répartis en 4 groupes majeurs :

- cycliques, avec un pont disulfure,
- linéaires, souvent en hélice sans cystéine,
- munis de 2 ponts disulfure ou plus, avec une structure tridimensionnelle en feuillets β ,
- linéaires sans cystéine avec une proportion importante d'acides aminés (AA) inhabituels, tels que **les peptaïbols**. Ce groupe comprend les peptides les plus étudiés (Oren et Shai, 1998).

3- DÉFINITION DES PEPTAÏBOLS

D'origine seulement fongique (Lee *et al.*, 1999), les peptaïbols sont définis comme étant une classe de molécules antibiotiques (Reiber *et al.*, 2003 ; Shenkarev *et al.*, 2004) et toxiques importantes (Becker *et al.*, 1997 ; Wada et Tanaka, 2004). Selon Degencolb *et al.* (2003), le nom **peptaïbols**⁴ (**peptides acide α -amino iso butyrique amino alcool**) a été proposé pour la première fois par Benedetti *et al.* (1982) et Brückner *et al.* (1984). Il désigne les peptides dotés des caractéristiques suivantes :

- poids moléculaire variant entre 500 et 2200 Da,
- structure linéaire,
- abondance d'AA inhabituels hydrophobes non codés : les α -alkyl- α -amino acides, surtout l'acide α,α -diméthyl amino acide ou acide α -amino isobutyrique⁵ (U) et l'Isovaline (J) (Reiber *et al.*, 2003),

⁴ En 1991, Brückner *et al.* proposent le terme **peptaibiotic** pour désigner :

- les peptaïbols doués de bioactivité et contenant l'acide α amino isobutyrique (U) ainsi que
- des peptaïbols contenant des lipoaminoacides et dont l'extrémité C-terminale est un simple AA, un 2-methoxy amino acide, une amine, un amide, dikétopipérazine ou un gluco-alcool (Becker *et al.*, 1997 ; Lucaciu *et al.*, 1997 ; Jaworski et Brückner, 2000 ; Chugh *et al.*, 2002 ; Kropacheva et Raap, 2002 ; Dogencolb *et al.*, 2003).

Pour les peptaïbols se terminant par une phénylalaninol (FOH) comme amino alcool, le nom **peptaïbophols** est proposé par Rinehart *et al.* (1977) (Toniolo et Borona, 1983 ; Brückner et Langer, 1990) et **céphaïbols** pour ceux qui sont antibiotiques, neuroleptiques et antihelminthiques (Bunkoczi *et al.*, 2003).

⁵ L'**acide α -aminoisobutyrique (U)** est un AA rare sur Terre. Il a été découvert en large proportion sur des chondrites carbonés (météorites) datant de la période Crétacé/ Tertiaire (Zhao & Bada, 1989). L'U, non codé, est présent uniquement dans les peptaïbols (Duclohier *et al.*, 2003), c'est un α -alkyl- α -amino acide avec plusieurs synonymes : 2-alkylamino acide ou bien α,α -dialkyl- α -amino acide ou $C_{\alpha\alpha}$ -dialkylglycine). L'U est d'une haute valeur fonctionnelle, il est

- origine fongique,
- issus d'une biosynthèse protéique non ribosomique,
- et, en milieu neutre, comprenant une partie N-terminale **hydrophobe chargée positivement** souvent constituée d'un résidu U acétylé (Fig. 3) et une partie C-terminale **hydrophile chargée négativement** souvent constituée d'un amino alcool (Iida *et al.*, 1995 ; Rebuffat *et al.*, 1995 ; Becker *et al.*, 1997 ; Grigoriev *et al.*, 2002 ; Brückner & Koza, 2003).

Des extrémités terminales exceptionnelles ont été trouvées chez une minorité de peptaïbols. Certains ont une partie C-terminale dotée d'une fonction alcool modifiée (aibelline), d'autres en sont carrément dépourvus et sont alors terminés par :

- une Glutamine (trichobrachine),
- une prolineamide (P-NH₂ chez pseudokonine KL III),
- un cycle hydroxyketopipérazine (pseudokonine KL VI),
- un hydrocarbure (clonostachine),
- des parties linéaires ou cycliques inhabituelles (trichopolyne),
- une amine ou bien un amide (Rebuffat *et al.*, 2000 ; Degencolb *et al.*, 2003).

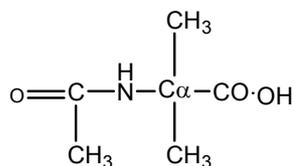


Fig. 3 : Acétyl diméthyl - α dialkyl α amino acide (Ac-U).

4- MODES DE CLASSEMENT

Deux modes de classement ont été successivement établis pour les peptaïbols.

Le premier prend en compte la nature et le nombre des résidus qui les constituent. Il les répartit en 3 sous-classes :

- les peptaïbols à longue séquence (longues chaînes) avec 18 à 20 résidus contenant une Proline (P) centrale (AA hydrophile) et des résidus Glutamine (Q) près des extrémités N et C-terminales,
- les peptaïbols à courte séquence (courtes chaînes) avec 11 à 16 résidus munis de plusieurs paires U-P, la plupart contiennent alors la séquence N-terminale acétyl-acide α amino isobutyrique-Asparagine (Ac-U-N) ou bien acétyl-acide α amino isobutyrique-Glutamine (Ac-U-Q)
- et les lipopeptaïbols avec 7 ou 11 résidus dotés de plusieurs résidus Glycine (G) et une extrémité N-terminale acylée par un acide gras à 8 ou 10 carbones (chaîne terminale lipidique) (Lucaciu *et al.*, 1997 ; Rebuffat *et al.*, 2000).

Avec l'accroissement du nombre de séquences de peptaïbols publiés (plus de 300 molécules) et des travaux s'y rattachant, Chugh et Wallace (2001) proposent un second modèle de classification qui complète le premier en se basant non seulement sur le nombre de résidus de la séquence, mais aussi sur la nature des AA constitutifs, la bioactivité de chaque peptaïbol et les espèces fongiques qui en sont productrices (Chugh *et al.*, 2002). Ce système répartit les peptaïbols en 9 sous-familles (SF, *subfamilies* ; SFs) (Reiber *et al.*, 2003) (tableau 1).

Tableau 1 : Les 9 sous familles de peptaïbols (d'après Chugh et Wallace, 2001)

SF	Nombre de séquences et activité*	Nombre de résidus	Caractéristiques structurales	Nombre d'espèces productrices
SF1	+ 120, actifs	17-20	U très fréquent Qx vers milieu des séquences (R** 18 et 19) P : R 18 et 19	Non défini
SF2	34, actifs	14-16	U très fréquent, Qx : R 6 et 11, P : R 10 et 13, F : sur partie C et N terminales	6
SF3	18, actifs	16-17	T : R 6, présence G, 2 R Qx, F : sur partie C et N-terminales	3
SF4	+ 50, actifs	8-14	Qx ou N : R 2, P : R 5, 9 et 13, pas de R aromatiques	Non défini
SF5	5, inactifs	7-11	Pas de P, riche en G	3
SF6	10	15	U très fréquent, Qx : R 14, Lx : R 15, W : R 1	2
SF7	3	11	2 R P ; L partie C-terminale, Qx : R 5, 6 et 9	1
SF8	1, clonostachine	14	3 R U, absence de Qx et R aromatiques	1
SF9	8, inactifs	5-7	Absence de P et Qx	1

* formation de pores ioniques dans les bicouches phospholipidiques, ** résidus

Il ne semble pas exister de corrélation entre l'appartenance à une SF et la bioactivité des peptaïbols (Chugh *et al.*, 2001).

5- ORIGINE BIOLOGIQUE

Plusieurs espèces du genre *Trichoderma* (*T. atroviridae*, *T. harzianum*, *T. longibrachitum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*, *T. reesei*, *T. polysporum*, *T. saturnisporum*, *T. virens* et *T. viridae* ; *T. asperellum*) produisent une grande variété de peptaïbols (Brückner *et al.*, 1987a ; Oh *et al.*, 2000 ; Chutrakul et Peberdy, 2005). D'autres genres et espèces synthétisent également ces métabolites secondaires mais avec une gamme bien plus restreinte ; il s'agit de : *Acremonium* sp., *Paecilomyces* sp., *Boletus* sp., *Cephalosporium* sp., *Emericellopsis* sp., *Gliocladium deliquensens*, *Hypocrea* sp., *Mycogone cervina*, *M. rosea*, *Samarospora* sp., *Sepedonium chrysospermum*, *Stilbella erythrocephala*, *S. fimetaria*, *S. flavipes*, *Tolypocladium inflatum*, *Verticimonosporium ellipticum* (Brückner et Przybylski, 1984a, b ; Brückner *et al.*, 1987c ; El Hajji *et al.*, 1987 ; Brückner *et al.*, 1991 ; Leclerc *et al.*, 1998b ; Lee *et al.*, 1999 ; Oh *et al.*, 2000 ; Jaworski et Brückner, 2000 ; Jaworski et Brückner, 2001 ; Dogenkolb *et al.*, 2003 ; Wilhelm *et al.*, 2004).

Quant à leur utilité pour la cellule, ces peptides semblent être un moyen de défense et de compétition pour les ressources nutritives. Par leur bioactivité, les peptaïbols contribuent à la survie et au dynamisme des organismes producteurs. Dans certaines conditions, ils sont capables d'inhiber la croissance d'autres organismes contigus, et protègent les spores de la consommation animale (Moss, 1986 ; Oren et Shai, 1998 ; Weber et Marahiel, 2001 ; Marahiel *et al.*, 2003).

6- STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE ET CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES DES PEPTAÏBOLS

La séquence d'un peptaïbol, c'est-à-dire l'ordre d'enchaînement de ses AA, constitue sa structure primaire. Sa structure secondaire est relative à son organisation spatiale : il s'agit de sa conformation.

Les liaisons peptidiques $\text{CO}_i\text{-NH}_{i+1}$ qui lient les AA entre eux et les atomes $\text{C}\alpha_i$, $\text{C}\alpha_{i+1}$ avoisinant (Fig. 4) sont coplanaires.

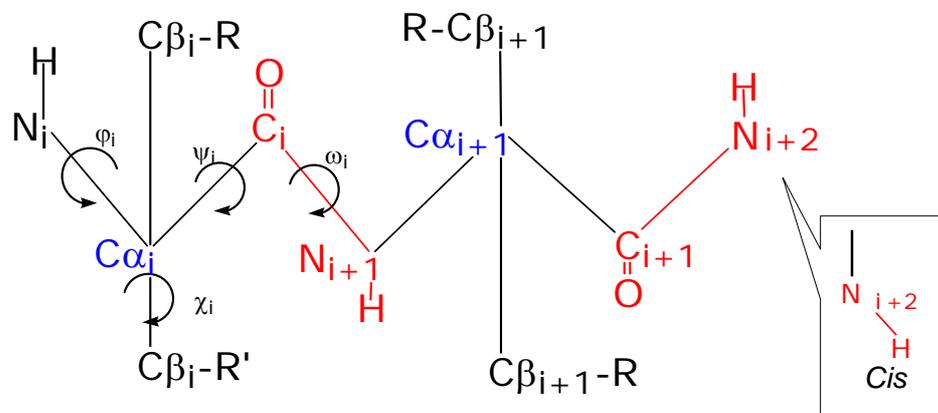


Fig. 4 : Organisation de la liaison peptidique et angles de torsion (d'après Bidon-Duchamp, 1993).

La structure secondaire d'un peptide peut être déterminée par les angles dièdres (angles de torsion) autour des liaisons $N_i-C_{\alpha_i}$ (φ_i), $C_i-C_{\alpha_i}$ (ψ_i), C_i-N_{i+1} (ω_i) et $C_{\alpha_i}-C_{\beta_i}$ (χ_i).

L'angle φ_i est l'angle de torsion de la liaison $N_i-C_{\alpha_i}$.

L'angle ψ est l'angle de torsion intra-résidu autour d'une liaison $C_{\alpha}-C_i$.

L'angle ω est l'angle de torsion de la liaison C_i-N_{i+1} . La présence de liaisons faibles à grande distance limite les valeurs de cet angle à 180° ou 0° , correspondant aux conformations *trans* et *cis*.

Les 3 principaux types de structures secondaires (hélices, feuilletts et les coudes β) d'un peptide sont stabilisées par les liaisons hydrogène intra ou intermoléculaires entre les carbonyles et les groupements NH du squelette peptidique.

6-1 hélice α (ou bien 3,6₁₃)

L'hélice α est la structure secondaire la plus répandue, stabilisée par les liaisons hydrogène 5-1 ($\text{CO}_i\text{-NH}_{i+4}$) parallèles à l'axe de l'hélice, formant un cycle de 13 atomes et 3,6 résidus AA. Les valeurs des angles φ et ψ correspondant à l'énergie minimale de torsion sont respectivement de $\pm 57^\circ$ et $\pm 47^\circ$. Les hélices α sont fondamentalement stables (Sansom, 1993 ; Jaworski et Brückner, 2000).

6-2 hélice 3_{10}

Cette hélice est la structure secondaire la plus fréquente après l'hélice α , stabilisée par les liaisons hydrogène 4-1 ($\text{CO}_i\text{-NH}_{i+3}$) parallèles à l'axe de l'hélice, formant un cycle de 10 atomes et 3 résidus AA. Les angles φ et ψ pour une l'hélice 3_{10} idéale sont respectivement de $\pm 60^\circ$ et $\pm 30^\circ$.

Les liaisons hydrogène intra-hélices des hélices 3_{10} ne sont pas linéaires. Ceci rend instable ce type d'hélice (Sansom, 1993 ; Jaworski et Brückner, 2000).

6-3 Feuilletts β et coudes β

Les feuilletts β sont constitués de chaînes polypeptidiques reliées entre elles par des liaisons hydrogène intermoléculaires. Les coudes β sont des séquences de 4 résidus qui adoptent une conformation permettant un repliement de 180° de la chaîne peptidique (Bidon-Duchamp, 1993 ; Alberts *et al.*, 1999).

Chez les peptaïbols, la présence du résidu $\text{C}_{\alpha,\alpha}$ dialkylés comme l'acide α aminoisobutyrique (U) réduit considérablement le degré de liberté conformationnelle du squelette peptidique. En effet, la présence d'un groupement CH_3 additionnel sur le carbone chiral C_α des résidus $\text{C}_{\alpha,\alpha}$ dialkylés impose une conformation spatiale avec des angles $\varphi=57^\circ$ et $\psi=47^\circ$. Ces valeurs très restreintes rendent l'U fortement hélicogène (Reiber *et al.*, 2003). Un peptaïbol composé d'environ 40% d'U se structure en hélice très stable (Kelsh *et al.*, 1992) du type α et 3_{10} dont le sens est imposé par la configuration absolue des AA chiraux. La conformation 3_{10} est préférée chez des peptides de moins de 8 résidus (Iida *et al.*, 1995 ; Lucaciu *et al.*, 1997 ; Rebuffat *et al.*, 2000 ; Grigoriev *et al.* 2002 ; Chugh *et al.*, 2002 ; Bunkoczi *et al.*, 2003).

Bien que l'hélice α soit la plus répandue dans les peptaïbols, la structure de certains est un mélange des 2 formes α et 3_{10} en plus de la forme en coude β positionné entre la partie N-terminale et celle C-terminale, souvent au niveau d'une Proline (P) ou une Hydroxyproline (O) (Lucaciu *et al.*, 1997 ; Jaworski et Brückner, 2000).

7- LA BIOSYNTHÈSE DES PEPTAÏBOLS

Durant la dernière décennie, des recherches ont été menées pour la compréhension des principes moléculaires et structuraux régissant cette biosynthèse et des progrès considérables ont été réalisés dans ce domaine (Weber et Marahiel, 2001).

Jusqu'au début des années soixante, la synthèse habituelle d'un fragment peptidique découlait forcément de la transcription d'une séquence d'ADN en ARNm (messager), traduit ensuite en une chaîne d'AA au sein des ribosomes.

Cependant, plusieurs biomolécules protéiques d'intérêt pharmacologique (antibiotiques, immunosuppresseurs...) étaient connues pour renfermer dans leur séquence une forte teneur en AA méconnus par les ribosomes, notamment les formes dextrogyres (D) (Matsunaga et Fusetani, 2003).

Ces peptides étaient-ils issus d'une voie de synthèse peptidique non ribosomique ?

Les résultats de travaux d'équipes norvégiennes et japonaises ont conforté cette hypothèse en démontrant que la gramicidine S (protéine) est synthétisée même en absence de structures ribosomiques et d'ARN, mais toujours en présence de grosses molécules enzymatiques intracellulaires aux fonctions jusque-là inconnues.

Lipman (Université Rockefeller, New York) démontra par la suite que ces méga-enzymes orchestrent effectivement cette biosynthèse insensible à la cycloheximide, la RNase, la puromycine et l'erythromycine (deux inhibiteurs de l'élongation de la chaîne peptidique par liaison aux ribosomes). Par contre, l'ATP lui est indispensable (Rebuffat *et al.*, 2000).

Aujourd'hui connues sous le nom de « peptide synthétases non ribosomiques » ou NRPS (*non ribosomal peptide synthetases*), ces enzymes constituent le gabarit (patron ou moule) de cette synthèse. Les NRPS sont d'importantes structures multienzymatiques multi-

sites (Reiber *et al.*, 2003) (Fig. 5) d'une grande longueur (jusqu'à 15 000 AA : la cyclosporine synthétase est la plus longue chaîne polypeptidique naturelle connue). Plusieurs gènes codant des NRPS ont été découverts depuis 1988, grâce à la biologie moléculaire (Dogenkolb *et al.*, 2003).

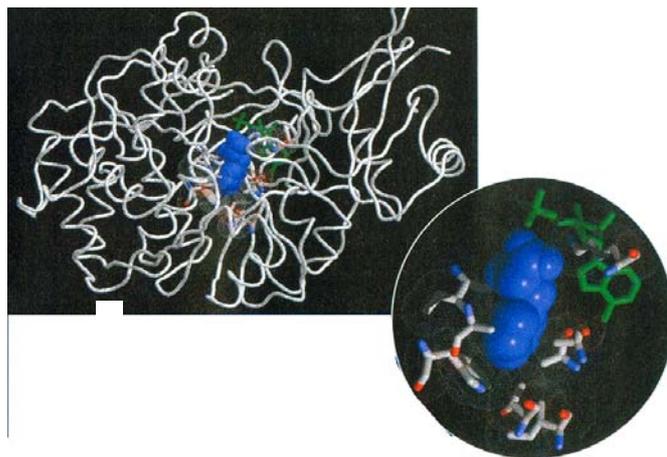


Fig. 5 : Sous-unité d'une peptide synthétase, ne reconnaît qu'un seul AA, la Phénylalanine (F, en bleu) (Marahiel *et al.*, 2003).

La biosynthèse des peptaïbols répond à ce schéma original de synthèse protéique par voie non ribosomique (Rebuffat *et al.*, 2000 ; Reiber *et al.*, 2003) permettant l'incorporation d'AA inhabituels, d'amino alcools et de lipo amino acides dans les séquences (Dogenkolb *et al.*, 2003).

Chaque NRPS est codée par plusieurs gènes, groupés sur une portion du génome. Wiest *et al.* (2002) ont réussi le clonage complet de l'une de ces peptaïbol-synthétases à partir d'une souche de *Trichoderma virens* (Vizscaino *et al.*, 2005).

L'étude en question a montré qu'une seule méga-peptaïbol-synthétase (2,3 MDa) suffit à produire un mélange de 3 peptaïbols différents. Il semblerait alors que la diversité

dans les séquences dépend non pas du nombre d'enzymes mais plutôt de la disponibilité des AA⁶ dans le milieu.

Les NRSP jouent le rôle de plans et d'ouvrières assembleuses. A l'image du cluster génétique qui la code, une NRPS est constituée de 10 à 22 sous-unités appelées modules, organisés en répétition. Chaque module est subdivisé généralement en 3 sous-unités semi-autonomes : les domaines (constitués d'environ 1000 AA) désignés C, A et T. Ils sont chargés de la reconnaissance, l'activation et l'incorporation d'un AA à la fois. Leur spécificité vis-à-vis des AA est variable (Rebuffat *et al.*, 2000).

Le module initial de chaque NRPS est dépourvu de la sous-unité C (Fig. 6) (Schwarzer *et al.*, 2001) et le module final est composé de domaines additionnels (en plus des 3 usuels) ; le domaine désigné E est responsable de la conformation et le domaine Te clôture la synthèse du peptaïbol.

Les domaines **A** (pour adénylation, environ 55 KDa) reconnaissent les AA. En présence d'ATP, ils les modifient pour les activer sous la forme d'amino-acyl adénylate (**AAA**), afin de les fixer sur les domaines **T** (10 KDa) adjacents (Fig. 6a).

Les domaines **T** (pour thiolation) agissent comme cofacteurs, ils attachent des groupements thiol sur les AAA rendant possible leur transfert et fixation sur les domaines **C** (pour condensation, 50 KDa) des modules voisins. Les domaines **C** relient entre eux les AA par des liaisons peptidiques. Le peptide naissant se détache de tous les domaines **T** mais reste attaché à la NRPS un niveau du domaine **Te** (pour terminaison) (Fig. 6b) contenu dans le dernier module. La conformation des AA du peptaïbol est alors définie (Fig. 6c), avant sa libération (Fig.6d) par action d'une thioestérase, contenue dans le dernier domaine (Schwarzer *et al.*, 2001).

Par un mécanisme peu connu, l'extrémité C-terminale libre est bouclée le plus souvent par un amino-alcool, donnant ainsi naissance à un peptaïbol. Des touches finales (Fig. 6e) peuvent être apportées par des enzymes dites de « finition ».

⁶ **LA BIOSYNTHÈSE DES AA CHEZ LES MICROMYCÈTES** : LES CHAMPIGNONS SONT CAPABLES DE SYNTHÉTISER LES 20 AA USUELS DES DEUX SÉRIES L ET D, EN PLUS D'AUTRES PARTICULIERS, EN PARTANT DE L'AMMONIAQUE ENVIRONNANT PROVENANT SOIT DE LA DÉGRADATION ENZYMATIQUE DE COMPOSÉS AZOTÉS ORGANIQUES OU INORGANIQUES OU BIEN SUITE À LA FIXATION BACTÉRIENNE DE L'AZOTE ATMOSPHÉRIQUE. LE RYTHME DE CROISSANCE ÉLEVÉ DES *TRICHODERMA* SP. LEUR PERMET D'ASSIMILER RAPIDEMENT L'AMMONIAQUE. LA BIOSYNTHÈSE DES AA EST INITIÉE PAR LA PRODUCTION DE GLUTAMATE (E), RARE ET PRÉCIEUX DANS LA NATURE, CAR IL EST LA TRAME DE SYNTHÈSE DU RESTE DES AA ET SE TROUVE DE CE FAIT À DES CONCENTRATIONS ÉLEVÉES DANS LES CELLULES VIVANTES (AHMED *ET AL.*, 1995 ; VOET ET VOET, 1998).

Une même souche est capable de produire des peptaïbols communs mélangés à d'autres de terminaisons particulières formant ainsi des assortiments très complexes. Ceci montre qu'à côté des mécanismes de bouclage par la fonction alcool, existent d'autres processus pour les terminaisons particulières (Kleinkauf et Rindfleisch, 1975 ; Rindfleisch et Kleinkauf, 1976 ; Rebuffat, 2000). Les études en cours sur les NRPS permettront certainement d'en connaître encore mieux les mécanismes (Vizscaino *et al.*, 2005).

Le mécanisme de biosynthèse modulaire des peptaïbols a un aspect particulier (Bunkoczi *et al.*, 2003) en raison de la spécificité variable des différents modules vis-à-vis des AA (Brückner *et al.*, 1985). Certains sont monospécifiques, alors que d'autres sont plurispécifiques. Ainsi, dans la séquence d'un peptaïbol, on retrouve des résidus de nature et de positions constantes (en raison des modules monospécifiques) alors que le reste des séquences est sujet à des variations d'AA (à cause des modules plurispécifiques) (Przybylski *et al.*, 1984 ; Brückner et Przybylski, 1984a ; Das *et al.*, 1988 ; Jaworski et Brückner, 1999).

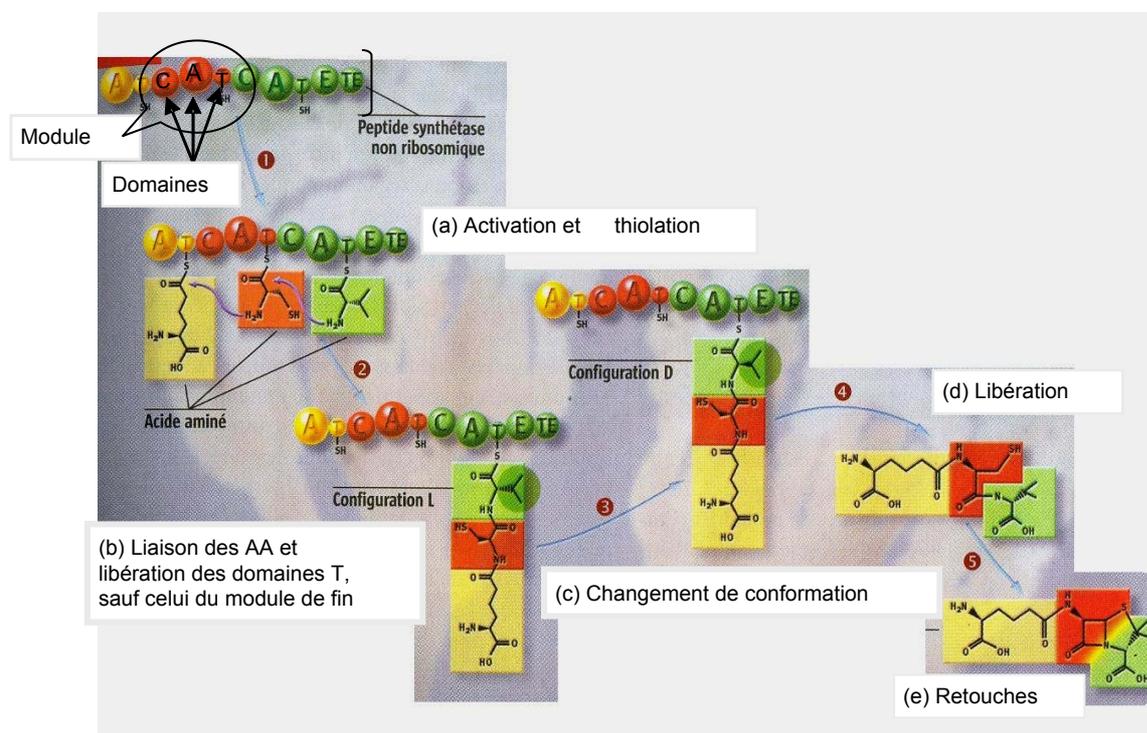


Fig. 6 : Mécanisme de biosynthèse de peptaïbols par une peptide synthétase non ribosomique, constituée de modules (en jaune, rouge et vert), composé chacun de domaines. Le domaine « A » de chaque module reconnaît spécifiquement les AA, il les active puis les fixe sur le domaine « T » (a). (b) Le domaine « C » forme la liaison entre les AA et les détache de tous les domaines T à l'exception de celui du module de terminaison (en vert). (c) Ce module contient le domaine « E » capable de changer la conformation des AA. (d) Le domaine « Te » du module de terminaison libère le peptide préfinal qui peut subir des retouches par l'action d'enzymes de finition (e) (d'après Marahiel *et al.*, 2003).

7-2 Le phénomène de microhétérogénéité des peptaïbols

C'est la raison pour laquelle les peptaïbols sont fréquemment trouvés sous forme de séquences analogues de même nombre de résidus (appelée aussi mélanges microhétérogènes) même dans leur état analytiquement le plus pur (cristaux) (Brückner *et al.*, 1985 ; El Hajji *et al.*, 1987) et le phénomène est désigné par la « microhétérogénéité des peptaïbols » (Reiber *et al.*, 2003).

Ces différences ponctuelles dans les séquences entraînent des variations dans la charge, la polarité, la taille et la bioactivité des peptaïbols analogues (Bodo *et al.*, 1989 ; Berg *et al.*, 2003 ; Brückner et Koza, 2003). Mais le degré de ces variations ne suffit souvent pas pour permettre une séparation analytique de ces mélanges microhétérogènes, notamment par CLHP (Jaworski *et al.*, 1998).

Plusieurs exemples peuvent illustrer cette particularité structurale. Le tableau 2 rapporte l'exemple de l'analogie structurale entre l'alaméthicine et ses 5 analogues naturels : alaméthicine Rf 50, l'hypelcine_A I (Matsuzaki *et al.*, 1989), la suzukacilline (Jung *et al.*, 1976 ; Boheim *et al.*, 1978), la paracelsine_A (Brückner et Graf, 1983 ; Brückner *et al.*, 1984) et la saturnisporine-SA II (Goulard *et al.*, 1995).

Tableau 2 : L'alaméthicine et ses analogues structuraux

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Alaméthicine Rf 30	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	FOH
Alaméthicine Rf 50	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	FOH
Hypelcine_A I	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	L	U	G	U	U	P	V	U	U	Q	Q	LOH
Suzukacilline	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	U	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	FOH
Paracelsine_A	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	U	U	P	V	U	U	Q	Q	FOH
Saturnisporine-SA II	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	L	U	G	U	U	P	V	U	J	Q	Q	FOH

8- LA BIOACTIVITE DES PEPTAÏBOLS

Des tests réalisés *in vitro* sur microorganismes et cellules animales montrent que, grâce à leur capacité d'interaction avec les membranes phospholipidiques -dont ils perturbent les propriétés- (Chugh et Wallace, 2001), les peptaïbols sont :

- antibactériens : grâce à leurs charges positives, ils se déposent facilement à la surface négativement chargée des bactéries, certains sont actifs sur les Gram⁺, d'autres sur les Gram⁻ tandis que d'autres le sont sur les 2 types (Oren et Shai, 1998 ; Beven *et al.*, 1999 ; Higashimoto *et al.*, 1999 ; Chugh et Wallace, 2001 ; Leclerc, 2001 ; Chugh *et al.*, 2002)
- antimycoplasmique, actifs donc sur les plus petits organismes procaryotes, auto-répliquants, pathogènes et résistants à la plupart des antibiotiques (Cosette *et al.*, 1999)
- antifongiques (Leclerc *et al.*, 1998a ; Grigoriev *et al.*, 2003)
- antiprotozoaires, inhibiteurs de la multiplication cellulaire des amibes ; les trichorzianines A et B lysent l'amibe *Dictyostelium discoïdeum* (Brückner, 1984 ; Bodo *et al.*, 1989)
- stimulateurs de la sécrétion de catécholamines (médiateurs endogènes) par les cellules chromaffines des glandes médullosurrénales (Tachikawa *et al.*, 1991 ; 1995 ; 1996)
- inhibiteurs de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries des cellules hépatiques de Rat (Okuda *et al.*, 1994 ; Iida *et al.*, 1993 ; 1995 ; Oh *et al.*, 2000) et des spermatozoïdes de Porc (Peltola *et al.*, 2004)
- cellulolytiques (cellules de mammifères) et hémolytiques (Oh *et al.*, 2000) ; l'alaméthicine Rf 50 lyse les érythrocytes humains (Hlimi, 1997)
- immunomodulateurs (Iida *et al.*, 1999)
- insecticides (Brückner et Koza, 2003)
- neurotoxiques (Grigoriev *et al.*, 2002) sur Souris (Brückner et Przybylski, 1984a ; Pocsfalvi *et al.*, 1997, 1998 ; Jaworski et Brückner, 1999)
- antiviraux (peptaïvirines A et B, contre le TMV : *tobacco mosaic virus*) (Yun *et al.*, 2000).

Il est à noter que la majorité des effets biologiques des peptaïbols ont été obtenus en utilisant l'alaméthicine, et ne sont donc pas forcément représentatifs de l'activité réelle de tous les peptaïbols.

Les comparaisons des études effectuées sur des peptaïbols différents de l'alaméthicine, sont rendues difficiles par les dénominations variables d'une même structure.

Des travaux complémentaires sont donc nécessaires pour l'évaluation de l'action biologique des peptaïbols, notamment concernant la relation structure-activité d'une part, et les mécanismes d'action au niveau moléculaire d'une autre part.

Cependant, nous savons déjà que la bioactivité des peptaïbols est variable d'une molécule à l'autre. Malgré une uniformité apparente des structures, une légère différence, souvent au niveau des groupements CH₃ sur les résidus en position 5, 6, 8 et 12, est déterminante pour la bioactivité (Bunkoczi *et al.*, 2003).

Certaines de ces molécules ont une bioactivité restreinte, les peptaïbols courts par exemple n'agissent que sur des cellules de mycoplasmes. D'autres, même de longues séquences, ne sont actifs que sur des bactéries Gram⁺ et inactifs sur les membranes riches en stérols (lipides stabilisateurs des bicouches).

Par ailleurs, plusieurs peptaïbols possèdent un large spectre d'action (ex. l'alaméthicine, la paracelsine, la trichorzianine, l'aibelline, la trichovirine, la trichorozine, l'harzianine et la trichobrachine) (Epanand *et al.*, 1995 ; Becker *et al.*, 1997). Il semblerait que les mélanges microhétérogènes, dotés d'un ensemble de propriétés différentes, sont à l'origine de leur large gamme d'activité biologique (Bunkoczi *et al.*, 2003).

8-1 L'Etude du comportement membranaire des peptaïbols

Beaucoup de travaux ont visé la compréhension du mécanisme de bioactivité des peptaïbols (Oren et Shai, 1998). Suite à notre recherche bibliographique, il ressort que ce mécanisme est partiellement élucidé, au moins en ce qui concerne l'alaméthicine, utilisée là encore comme modèle dans la plupart des études. Ce peptaïbol est le modèle incontesté d'exploitation des processus de formation et de compréhension des interactions électrostatiques membranes-protéines et de la transition conformationnelle voltage-dépendante des canaux ioniques (CI) transmembranaires (Samson, 1993 ; Cafiso, 1994 ; Haris *et al.*, 2004).

Les recherches menées étudient la biophysique de ces peptides selon 3 types d'investigations :

- études structurales
- études des interactions peptaïbols-bicouches membranaires
- mesure des propriétés électriques des canaux peptaïbols formés dans les membranes.

Par ailleurs, des expérimentations réalisées sur membranes artificielles ont permis la mise au point de modèles moléculaires pour l'exploration :

- du processus d'activation voltage-dépendant des canaux peptaïbols
- de la structure tridimensionnelle de ces canaux et leurs interactions avec les ions circulants (Sansom, 1993 ; Duclouhier *et al.*, 2004).

8-2 Les canaux ioniques peptaïbols-induits

Les peptaïbols forment des CI voltage-dépendants dans les membranes cellulaires, dont ils modifient ainsi la perméabilité conduisant, à terme, à la mort des cellules (Brückner et Przybylski, 1984b ; El Hajji *et al.*, 1987 ; Matsuura *et al.*, 1993 ; Wada et Tanaka, 2004).

Les peptaïbols ont été de ce fait admis parmi les PFC (Peptides Formant des Canaux membranaires ; *CFP, channel forming peptides*) et sont considérés comme des modèles de CI formés par l'agrégation d'un ensemble de monomères transmembranaires avec création d'un pore central (Kropacheva et Raap, 2002).

Comme nous l'avons précédemment vu, les peptaïbols adoptent une structure secondaire en hélices α et/ou 3_{10} dans les milieux hydrophobes. Les extrémités N et C-terminales constituent respectivement le pôle positif et négatif de ces monomères (Oren et Shai, 1998 ; Oh *et al.*, 2000).

Dans ce dipôle hélicoïdal, les AA constitutifs sont organisés de façon à former un cylindre dont la surface externe est longitudinalement et équitablement divisée en 2 faces, l'une hydrophobe (porteuse des AA hydrophobes) et une autre hydrophile (dotée des AA hydrophiles).

En absence de différence de potentiel, les peptaïbols adhèrent à la membrane (par leur côté hydrophobe) et où des interactions hélice/hélice ont lieu (Bidon-Duchamp, 1993 ; Iida *et al.*, 1995 ; Sharman *et al.*, 1996 ; Rebuffat *et al.*, 2000).

Du fait de l'existence du voltage (issue d'une différence de potentiel entre les faces interne et externe de la membrane) les monomères changent de conformation, de position et d'orientation par rapport à la membrane et s'organisent de façon à former un CI. Par effet de cascade, l'engagement des monomères dans le CI provoque l'activation des hélices libres sur la même membrane, les engageant dans la naissance de nouveaux CI (Sansom, 1993).

Ce processus, dit **d'activation voltage-dépendante** est plus complexe que celui des CI des pompes à K^+ et à Na^+ des cellules excitables (Sansom, 1993), et les modèles dits « modèle de douve de tonneaux » et « modèle du mécanisme en tapis » expliquent le mieux ce phénomène en concordance avec les données expérimentales (Cafiso, 1994).

8-2-1 Le « modèle de douves de tonneaux » (*barrel-stave model*)

Décrit par Baumann et Muller (1974) ainsi que par Boheim (1978) pour l'alaméthicine, il est inspiré de celui d'Inouye (1974) concernant la structure d'une lipoprotéine membranaire d'*Escherichia coli*. Ce modèle répond aussi au fonctionnement d'autres toxines biologiques (les δ -toxines de *Staphylococcus aureus*, les δ -endotoxines de *Bacillus thuringiensis* et celles du virus de l'influenza) (Samson, 1993 ; Epanand *et al.*, 1995 ; Beven *et al.*, 1999).

La formation des CI par ce modèle (Fig. 7) se ferait en 4 étapes et impliquerait une répartition homogène des charges électriques des hélices :

- Etape 1 : dépôt des hélices sur la membrane et interaction avec les phospholipides (Fig. 7 étape 1),

- Etape 2 : par action du voltage naissant d'une différence de potentiel membranaire, les monomères vont s'insérer et s'orienter perpendiculairement à la bicouche membranaire (Fig. 7 étape 2),

- Etape 3 : les hélices se reconnaissent, se rassemblent et s'organisent (Fig. 7 étape 3) de façon à orienter leur face polaire du même côté (Fig. 8), c'est l'agrégation,

- Etape 4 : les hélices (6 à 8 en générale) se lient entre elles à l'aide d'interactions de certains AA d'une hélice avec ceux de la voisine (Fig. 9). Le polymère ainsi verrouillé interagit, par sa face apolaire, avec les chaînes acyl gras des lipides. Sa face polaire libère un pore hydrophile transmembranaire (Fig. 7 étape 4) (Bidon-Duchamp, 1993 ; Iida *et al.*,

1995 ; Sharman *et al.*, 1996 ; Higashimoto *et al.*, 1999 ; Rebuffat *et al.*, 2000). Ces assemblages sont stabilisés par des interactions peptides-peptides, peptide-eau, et peptide-lipide (Samson, 1993 ; Epanand *et al.*, 1995).

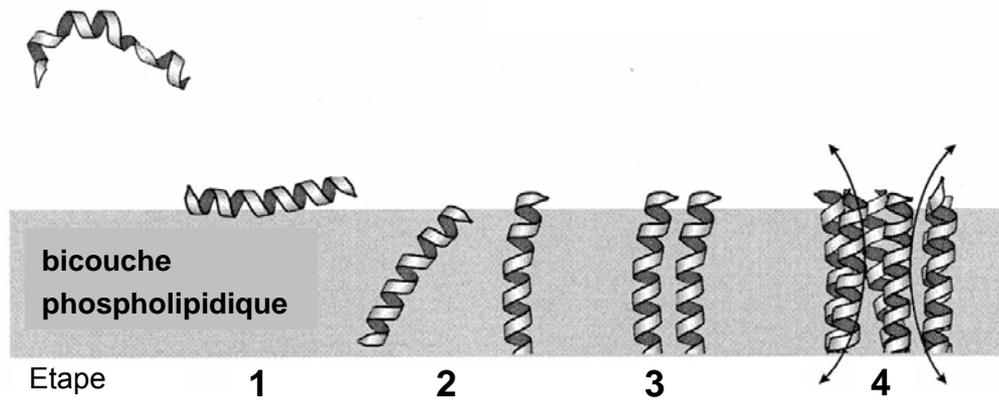


Fig. 7 : Formation d'un CI peptaïbol-induit selon le « modèle de douves de tonneaux », 1- adhésion, 2- insertion et orientation, 3- agrégation, 4- ouverture du CI (d'après Tieleman *et al.*, 2001).

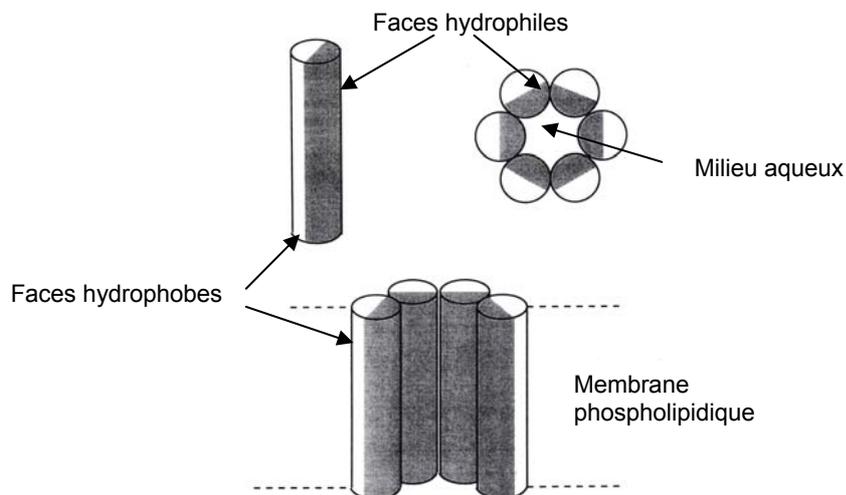


Fig. 8 : Polarité des monomères de peptaïbols et leur organisation dans les membranes phospholipidiques (d'après Sansom *et al.*, 1993).

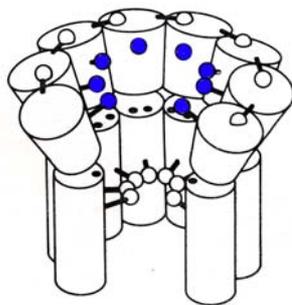


Fig. 9 : Organisation des hélices peptaïbols pour former un CI.
Les sphères blanches au sommet sont des résidus Q19 (Glutamine), au centre en bleu des Q17 et en bas des Q7 (d'après Fox, 1982).

8-2-2 Le modèle du « mécanisme en tapis » de Baumann et Mueller, (1974) (*carpet-like mechanism*)

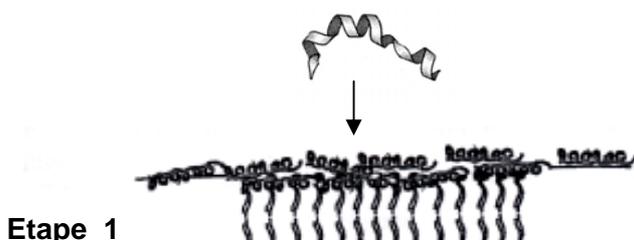
Ce second modèle stipule que les monomères accolés parallèlement sur la surface membranaire subissent une rotation de 90° sous l'effet d'un voltage pour s'y insérer perpendiculairement et s'agréger pour entourer des parties entières de membrane (Cafiso, 1994 ; Tieleman, 1999, 2001).

La charge des peptaïbols est légèrement positive, et celle de la membrane-cible est négative. Les forces électrostatiques lient alors les hélices à la membrane, qui la recouvre partiellement ou intégralement comme une sorte de tapis. Une fois un certain seuil de concentration d'hélices de peptaïbols atteint, ces dernières se lient à des groupes entiers de phospholipides (sans s'insérer individuellement dans la membrane).

Ce processus se déroulerait en 3 étapes :

- Etape 1 : Les monomères peptidiques chargés positivement se lient aux phospholipides chargés négativement (Fig. 10 étape 1),
- Etape 2 : En s'agréant, les résidus hydrophobes s'orientent vers les parties hydrophobes de la membrane (Fig. 10 étape 2),
- Etape 3 : Enveloppement de parties entières de la membrane (Fig. 10 étape 3) (Epanand *et al.*, 1995 ; Oren et Shai, 1998).

Des expériences menées par Kelsch *et al.* (1992) sur la mesure du temps de relaxation des carbones du squelette en RMN ¹³C montrent que le « modèle de douves de tonneaux » est le plus probable (Bidon-Duchamp, 1993 ; Cafiso, 1994).



8-2-3 Forme des canaux ioniques constitués

L'étude de Chugh *et al.* (2002) sur la formation des CI par la trichotoxine montre que le cylindre creux constitué par les hélices de peptaibols contient deux zones de bouclage, l'une sur l'extrémité N-terminale, entre les résidus Glutamine (Q6) et l'autre sur la partie C-terminale entre les résidus Q17 d'une hélice et l'acide α aminoisobutyrique (U16) de l'hélice suivante (Fig. 11).

Les parties N-terminales sont totalement convergentes, alors que celles C-terminales divergent relativement, formant ainsi un CI conique, sa partie fuselée est dirigée vers le côté interne de la membrane (Fig. 12) (Sansom, 1993 ; Chugh *et al.*, 2002).

Ce CI conique est étranglé au 2/3 de sa longueur à cause de la P (fortement hydrophile) (Fig. 13) (Chugh *et al.*, 2002). La taille du CI et sa conductance sont directement proportionnelles au nombre de monomères le composant (Cafiso, 1994 ; Epanand *et al.*, 1995 ; Kropacheva et Raap, 2002).

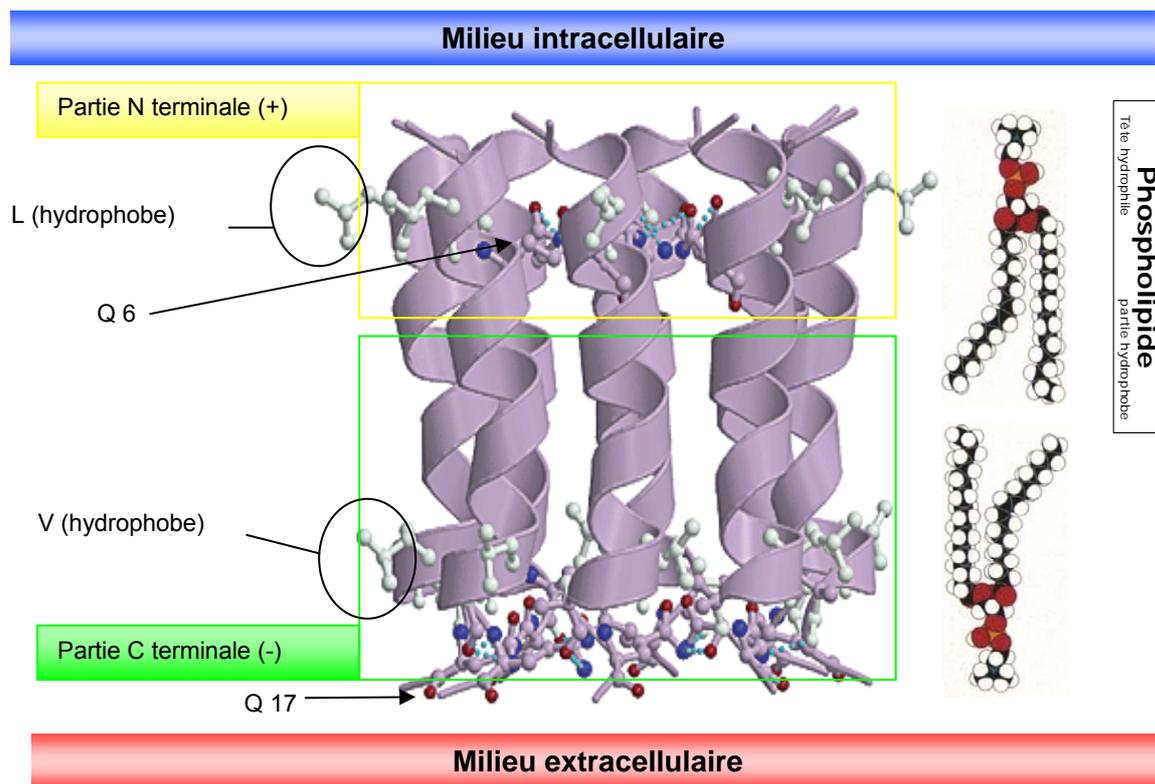
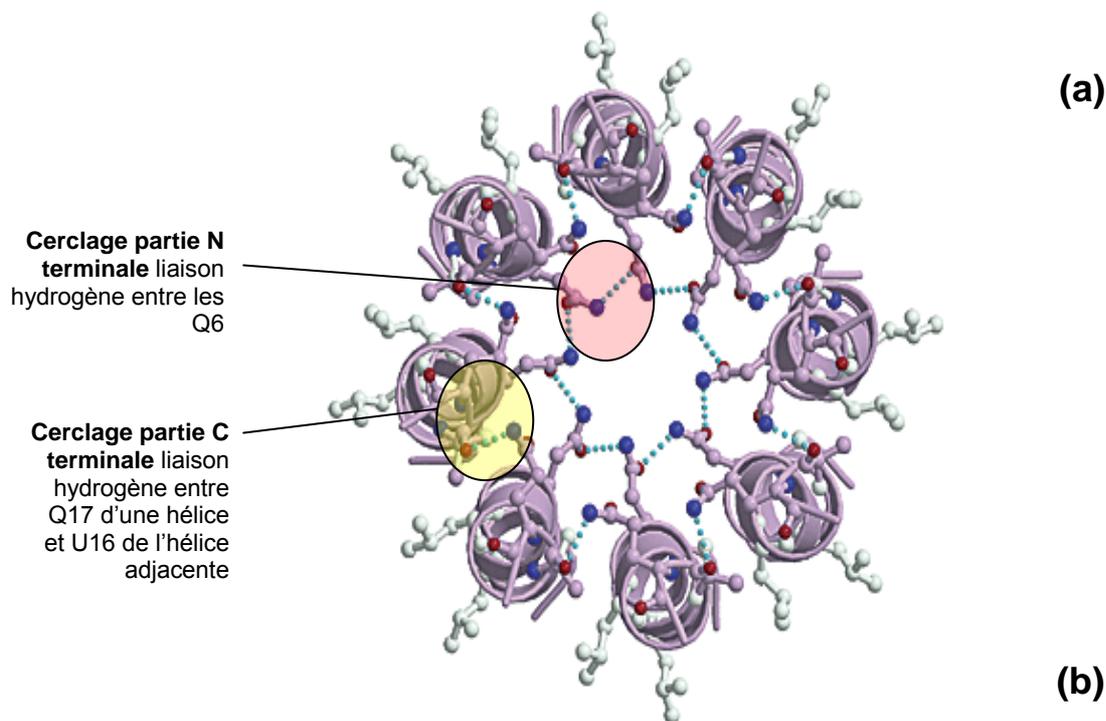


Fig. 11 : Modèle d'un canal octamérique de la trichotoxine inséré dans une bicouche phospholipidique, vue de haut (a) et de profil (b)

Des liaisons hydrogène (en pointillés bleus) relient les hélices via les résidus d'AA
 Sur la partie N-terminale, la liaison se fait entre les résidus Glutamine Q6
 Sur la partie C-terminale, le résidu Q17 d'une hélice et relié au U16 de l'hélice suivante
 Les sphères rouges et bleues représentent respectivement l'oxygène et l'azote
 Les AA hydrophobes sont orientés vers l'extérieur du canal ionique (d'après Chugh *et al.*,2002).

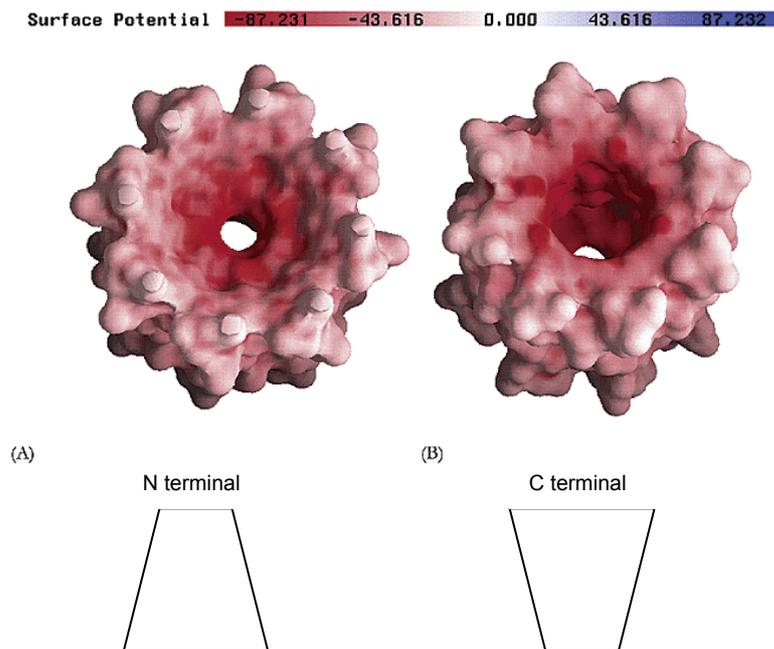


Fig. 12 : Surface électrostatique d'un canal octamérique, vue de la partie N-terminale (A) et de la partie C-terminale (B), 2 extrémités aux potentiels fortement négatifs faisant du pore un canal à cations (d'après Chugh *et al.*, 2002).

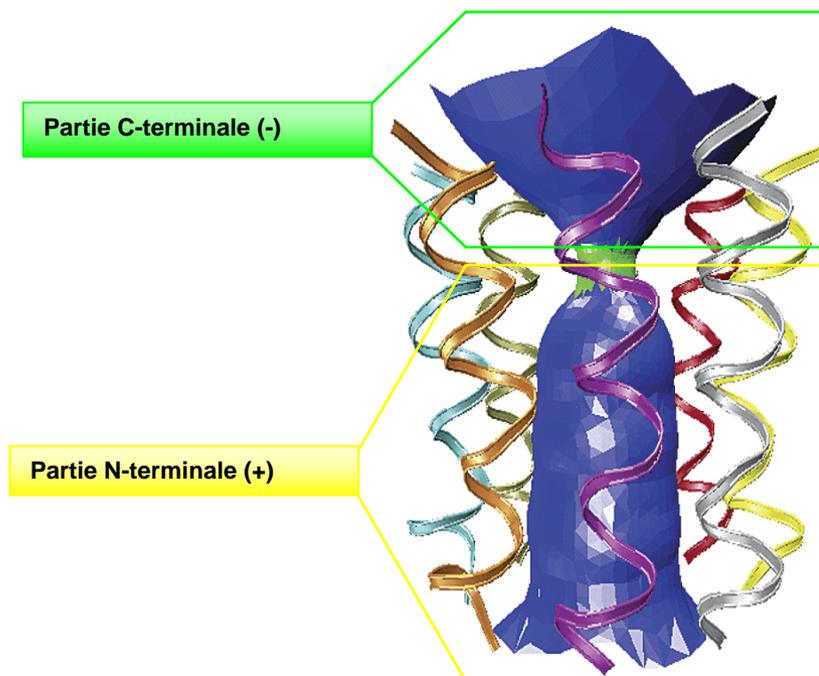


Fig. 13 : Aspect du CI conique et étranglé, formé par 8 hélices (enrubannées) de peptaïbols. Au niveau de la surface bleue, le diamètre du pore est $> 2,3 \text{ \AA}$. Au niveau de la surface verte, il est $< 2,3 \text{ \AA}$ et $> 1,15 \text{ \AA}$ (d'après Chugh *et al.*, 2002).

8-2-4 Formation de CI par les peptaïbols courts

Le cas singulier des petits peptaïbols mérite d'être évoqué à part, car aucun des 2 modèles susmentionnés ne semble leur convenir.

Une quarantaine de séquences de courts peptaïbols produites par le genre *Trichoderma* (principalement *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* et *T. viridae*) ont été jusque-là établies (www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home.shtml ; Berg *et al.*, 2003). Les peptaïbols courts sont constitués en général de 11 résidus avec 2 prolines (P) en position 6 et 10. Ils ont été moins étudiés que leurs semblables à longues chaînes. On a cependant remarqué que malgré leur taille réduite, les peptaïbols courts sont aussi formateurs de canaux ioniques transmembranaires, mais qui disparaissent rapidement.

Ainsi, les trichorozines I à IV, de taille inférieure à l'épaisseur des membranes cellulaires (Iida *et al.*, 1995) ou la trichogine GA IV de 16 Å de long, sont antibactériennes (*S. aureus*) et hémolytiques (sur hématies de mammifères) (Epanand *et al.*, 2001 ; Kropacheva et Raap, 2002). Sur Souris, les effets des peptaïbols courts au niveau neuronal sont chroniques, induisant hypothermies et dépressions de l'activité locomotrice (Berg *et al.*, 2003 ; Grigoriev *et al.*, 2003).

En absence de preuves expérimentales, deux hypothèses sont émises pour expliquer cette bioactivité. La première est que les petits peptaïbols possèdent une structure hélicoïdale originale, leur permettant de s'élonger par distorsion, due probablement à des interactions moléculaires intrinsèques qui provoquent des phénomènes d'élongation d'hélices, aidées par des déformations et des distorsions spontanés que montrent certaines bicouches biologiques (Lucaciu *et al.*, 1997).

La seconde hypothèse convient que 2 hélices de petits peptaïbols s'organiseraient en bout à bout au niveau des parties N-terminales, de façon à former une hélice de taille double de celle d'origine, capable dans ce cas de traverser les membranes plasmique et d'y former des CI (Rebuffat *et al.*, 1995 ; 2000 ; Chugh et Wallace, 2001).

Vu le nombre relativement faible des travaux consacrés à ces petits peptaïbols, des études complémentaires restent nécessaires pour une meilleure connaissance de ces peptides.

8-3 Facteurs régissant la formation et Le fonctionnement des CI peptaïbols

Des études menées par RMN et par diffraction aux rayons X à haute résolution montrent que la formation de pores membranaires par les peptaïbols dépend de facteurs extrinsèques et d'autres intrinsèques (Samson, 1993 ; Grigoriev *et al.*, 2002).

8-3-1 Facteurs extrinsèques

8-3-1-1 L'épaisseur de la membrane cible

Nous citerons ici le cas des mycoplasmes. Leur membrane plasmique pauvre en lipide et d'épaisseur réduite les rend sensibles à des peptaïbols courts pourtant inactifs sur les bactéries Gram⁺ (Rebuffat *et al.*, 2000).

8-3-1-2 Le taux d'hydratation des membranes biologiques

Les peptaïbols s'intègre facilement et perpendiculairement dans les membranes pauvres en eau (2 % eau partie/partie) (Samson, 1993).

8-3-1-3 Le taux de cholestérol membranaire

Les membranes cytoplasmiques de cellules animales riches en cholestérol induisent un rejet des monomères de peptaïbols (en priorité les plus longs). Ce lipide confère une protection de l'effet de ces toxines (Sharman *et al.*, 1996 ; Lucaciu *et al.*, 1997 ; Rebuffat *et al.*, 2000).

8-3-2 Facteurs intrinsèques

8-3-2-1 La nature des AA constitutifs

Certains AA sont fortement conservés dans les séquences. C'est le cas des résidus Glutamine Q7 et 18. La Q joue un rôle déterminant dans la définition de l'hydrophobie de la surface des peptaïbols. La Q7 précisément serait essentielle dans l'installation et la conductance des CI transmembranaires formés (Duclohier *et al.*, 2004).

C'est ainsi que certains analogues de peptaïbols sont 20 fois moins actifs que la forme d'origine. Deux exemples de peptaïbols illustrent bien ce cas, la trichotoxine et l'alaméthicine.

Ces deux peptaïbols perdent leur capacité à former des pores membranaires quand on leur substitue artificiellement les 2 résidus Glutamine (Q) qu'ils contiennent tous deux, par des Glutamates (E). (Chugh *et al.*, 2002 ; Duclohier *et al.*, 2004). En effet, des études ont montré que la présence du E dans les hélices provoquait leur répulsion entre elles, défavorisant ainsi la formation de CI membranaires (Chugh *et al.*, 2002).

Le résidu Proline (P) joue également un rôle important dans la bioactivité des peptaïbols, dont la majorité en contient au moins un résidu (Bunkoczi *et al.*, 2003), et certains jusqu'à 3 résidus (ex. la zervamicine, l'antimoebine et l'harzianine H-C). La présence de la P (souvent en position 14) dans la séquence des peptaïbols est à l'origine d'une « zone de vrillage ». L'exemple le plus cité dans ce cas est encore une fois celui de l'alaméthicine, dont l'hélice peptidique est divisée en 3 parties (Fig. 14) :

- de U1 à V9 hélice rigide
- de U10 à G11 zone charnière
- de L12 à F20 hélice rigide (Sansom, 1993 ; Chugh *et al.*, 2002).

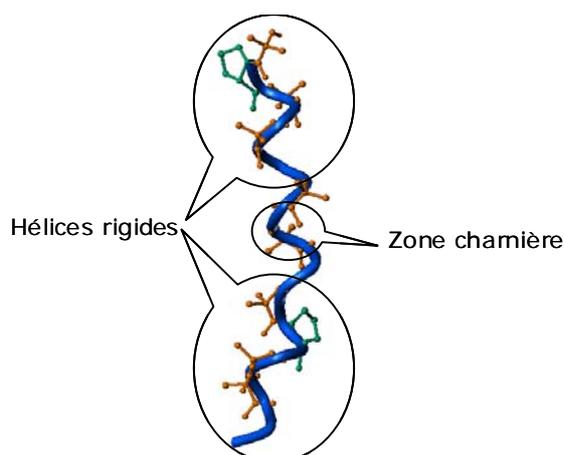


Fig. 14 : Structure 3D de l'alaméthicine, les 8 résidus U (en cannelle) sont responsables de la structure en hélice α (en bleu). En vert sont représentés les 2 résidus P (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/alaméthicine1.htm>).

La P déstabilise les liaisons hydrogènes de l'amide de l'AA13 et de l'AA15 (par un facteur de 35) formant une zone « charnière » reliant les parties C aux N-terminales, leur

permettant d'osciller autour de l'axe qu'elle constitue (Kelsh *et al.*, 1992 ; Duclohier *et al.*, 2003). La substitution de la P14 chez la melettine par l'Alanine (A) provoque la disparition du mouvement du peptaïbol ce qui réduit la capacité de la melettine modifiée à former des canaux ioniques transmembranaires (Dathe *et al.*, 1998).

Par ailleurs, les peptaïbols contenant des résidus aromatiques comme la Phénylalanine (F) montrent une plus grande stabilité dans la membrane phospholipidique (Haris *et al.*, 2004).

8-3-2-2 L'absence de l'extrémité acétylée N-azote-terminale rend inactifs les peptaïbols (Lucaciu *et al.*, 1997).

8-3-2-3 La taille (au moins égale à l'épaisseur de la membrane cible) (Lucaciu *et al.*, 1997 ; Rebuffat *et al.*, 2000) et **la charge négative** des peptaïbols favorisent la formation de CI à peptaïbols (Brückner et Przybylski, 1984b ; Bodo *et al.*, 1989 ; Epanand *et al.*, 1995 ; Iida *et al.*, 1995 ; Chugh et Wallace, 2001 ; Chugh *et al.*, 2002 ; Grigoriev *et al.*, 2003).

La compréhension du mécanisme d'action des peptaïbols mérite des investissements complémentaires, qui permettraient d'approfondir les connaissances des interactions de ces molécules avec les membranes plasmiques (Brückner *et al.*, 1987d ; Epanand *et al.*, 1995).

8-4 Spécificité ionique des canaux membranaires peptaïbols

Les études menées sur la spécificité ionique des canaux d'alaméthicine et de ses analogues montrent leur faible sélectivité ionique, bien que le passage des cations y soit facilité (Samson, 1993). Ces canaux sont plus probablement cationiques, souvent à Ca^{2+} (Tachikawa, 1991 ; Kitagawa *et al.*, 1998), mais aussi à Mn^{2+} , K^+ , Na^+ et Ni^{2+} (Fonteriz *et al.*, 1991 ; Dathe *et al.*, 1998 ; Chugh et Wallace, 2001 ; O'reilly et Wallace., 2003).

De nombreuses études utilisant des peptaïbols purs ont visé la compréhension de la sélectivité ionique des canaux à peptaïbols (Brückner et Koza, 2003), mais ce processus n'est pas entièrement compris.

La littérature que nous avons pu consulter à ce sujet, cite que la conductivité du Cl répond à un transport passif et est directement proportionnelle au rayon du pore et donc au nombre d'hélices le constituant (Sansom, 1993 ; Iida *et al.*, 1995).

Il semblerait que les extrémités N et C-terminales de ces canaux comportent un anneau interne de charges négatives qui joue un rôle marqué dans la conductance du Cl qui est, de ce fait, un canal à cations (Sansom, 1993 ; Chugh *et al.*, 2002).

8-5 Les peptaïbols et les autres toxines : synergie ?

La bioactivité de certaines toxines fongiques est amplifiée par la présence d'autres substances. Aux mêmes concentrations, leur potentiel toxique devient beaucoup plus important (Schirmböck *et al.*, 1994 ; Miller, 2000). Ce phénomène, nommé synergie, a été mis en évidence chez les peptaïbols, qui peuvent s'associer à d'autres substances contre les agents phytopathogènes (Becker *et al.*, 1997).

Cette synergie s'exprime également dans les phénomènes d'antagonisme connus chez les *Trichoderma* sp., utilisés de ce fait comme agents de biocontrôle dans les sols. A titre d'exemple, *Trichoderma harzianum* produit des chitinases et des glucanases responsables de l'antagonisme envers d'autres micromycètes tel que le *Botrytis cinerea*. L'action inhibitrice de ces enzymes sur la germination des spores et sur l'élongation des hyphes mycéliens de *B. cinerea* est intensifiée par la présence de peptaïbols, les trichorzianines.

Une étude menée par Nir-Paz *et al.* (2002) a démontré l'effet synergique des peptaïbols avec d'autres molécules bioactives. La fluoroquinolone est un antibiotique membrane-actif sur les mycoplasmes. Son activité est fortement promue par la présence d'alaméthicine, lors de tests réalisés sur des cellules HeLa (lignée d'un carcinome cervical humain) infectées de 2 espèces de mycoplasmes, *Mycoplasma fermentans* et *M. hyorhinis*.

Récemment, des expérimentations ont été menées pour étudier la possibilité d'utiliser les peptaïbols à des fins thérapeutiques. Wada et Tanaka (2004) ont démontré que les peptaïbols pouvaient jouer le rôle de vecteurs et favoriser la pénétration transmembranaire des molécules actives, étudiées dans le cadre de thérapie génique. Ce travail montre qu'à concentrations contrôlées, la [trichorovine TV_XIIa](#) (de *Trichoderma viridae*) complexée à un

oligodeoxynucléotide (ODN) le fait pénétrer à travers la membrane cytoplasmique de certaines cellules humaines, sans les endommager.

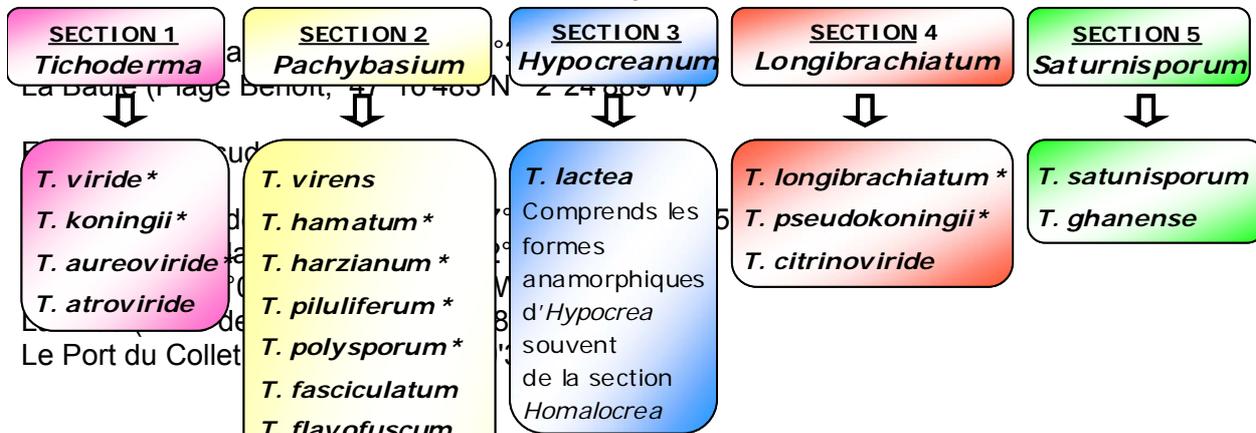
CHAPITRE 3 MATERIEL ET METHODES

1- OBTENTION DU MATERIEU BIOLOGIQUE

Trichoderma

1-1 Coordonnées géographiques des sites de prélèvements

Sept sites de prélèvements sont concernés (Fig. 15). Deux au nord de la Loire :



1-2 technique de transport et de conservation

Pour chaque site est réalisé à partir :

d'eau de mer de sédiments de coquillages ; moule, coquillage filtreur) et *Cerastoderma edule* L. (la coque, coquillage

Les échantillons de sédiments sont placés dans des flacons plastique stériles. Les coquillages sans précaution particulière, ils sont mis en sachets en plast

Fig. 2 : Les schémas de Trichoderma sp. et quelques-unes des espèces y appartenant, selon Bissett (1991a et b).

* Les espèces agrégées de Rifai (1969).

traitement au laboratoire pour l'isolement des champignons se fait le plus tôt possible.

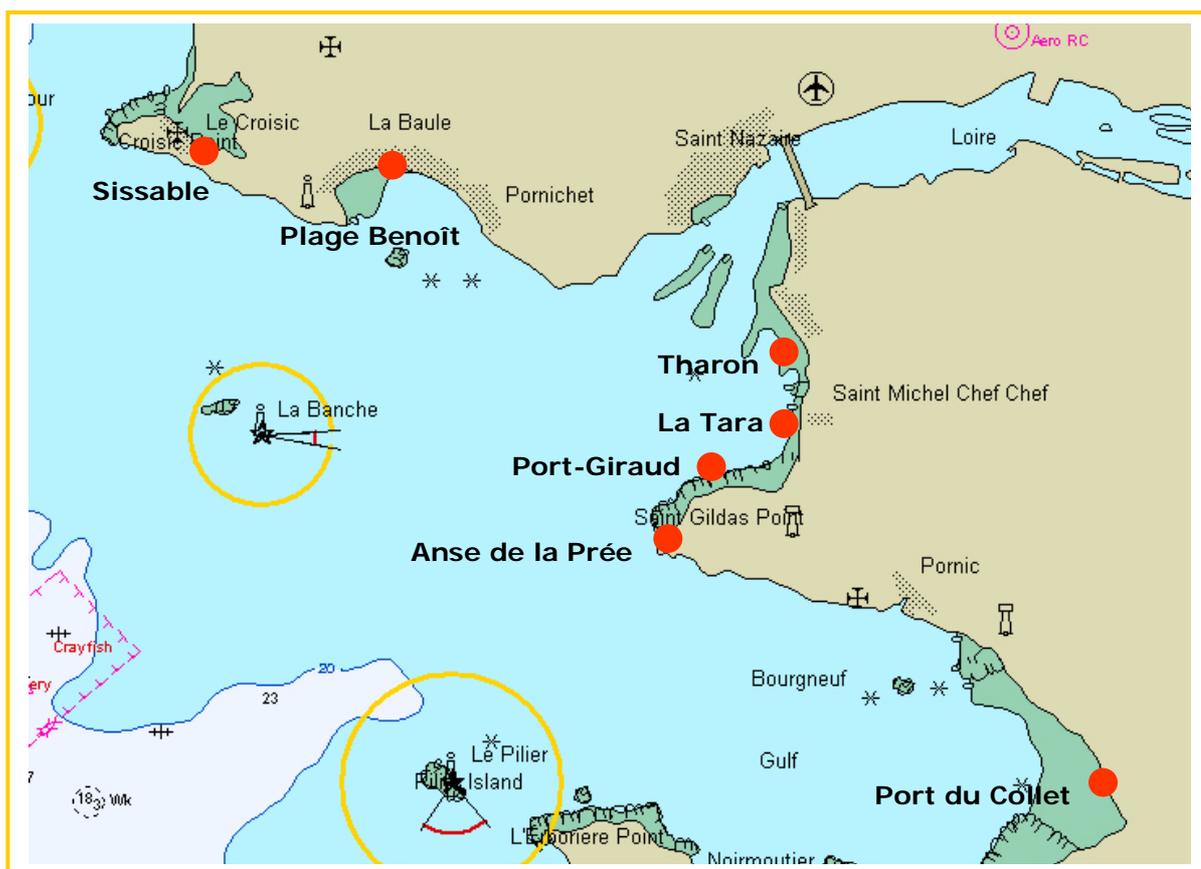


Fig. 15 : Lieux de prélèvements autour de l'estuaire de la Loire.

1-3 mise en culture pour l'isolement de souches

Toutes les manipulations microbiologiques sont réalisées dans des conditions d'asepsie sous hotte à flux laminaire avec l'appoint d'un bec Bunsen.

L'eau de mer utilisée pour notre travail nous a été fournie par les services de prélèvements de l'IFREMER et provient du Croisic (France). Nous la répartissons dans des bouteilles en verre pour la stériliser par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

La composition de cette eau est la suivante :

Ions	Concentration (mg/L)
F ⁻	4
Br ⁻	69
NO ₃ ⁻	22
SO ₄ ⁻	2600
Cl ⁻	19500*
NH ₄ ⁺	37
Mg ⁺⁺	1300
Ca ⁺⁺	470
K ⁺	390
Na ⁺	10600*

* estimation

Le milieu d'isolement est du Sabouraud Dextrose Agar (Difco™, référence 210950) à l'eau de mer (peptone, 10 g ; glucose, 35 g ; agar-agar, 15 g ; eau de mer naturelle stérile qsp 1 L, pH 5,7 ± 0,2).

Le milieu est porté à ébullition pour une complète dissolution de l'agar-agar puis réparti, selon les besoins, dans des :

- flacons (200 mL de volume final) pour couler des boîtes de Pétri,
- fioles de Roux (150 mL de volume final) pour la production de spores et la fermentation des peptaïbols.

La stérilisation du milieu se fait par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

A leur sortie de l'autoclave, les fioles de Roux sont couchées.

Les techniques de mise en culture varient selon le type d'échantillons :

Echantillons d'eau de mer : Etalement de 5 mL d'eau de mer sur la surface du milieu Sabouraud dans des boîtes de Pétri (20 cm Ø), à l'aide d'une pipette Pasteur incurvée en râteau.

Echantillons de sédiments : Un gramme de sédiments est additionné à 49 mL d'eau de mer stérile. Quelques gouttes de Tween 80 sont ajoutées pour mettre toutes les spores en suspension. Après agitation et décantation, 4 mL d'eau interstitielle sont pipetés puis étalés par la technique du râteau sur la surface du milieu Sabouraud.

Echantillons de coquillages : Les coquillages désinfectés à l'éthanol à 70% sont rincés à l'eau distillée stérile avant leur ouverture. La chair récupérée est lavée à l'eau de mer stérile puis broyée. Le broyat est centrifugé (2500 tours/min pendant 15 min). Un millilitre de surnageant est ensuite étalé sur du milieu Sabouraud.

Dans les 3 cas, l'incubation se fait à 27°C jusqu'à l'envahissement total de la surface de la gélose nutritive (entre 2 à 3 semaines).

1-4 isolement des souches

Pour chaque colonie fongique morphologiquement distincte, une öse de mycélium est prélevée puisensemencée dans des boîtes de Pétri (10 cm Ø) sur de la gélose Sabouraud. L'incubation se fait à 27°C, jusqu'à l'envahissement de la surface de la gélose (pendant 2 ou 3 semaines). Les souches pures ainsi obtenues sont identifiées.

1-5 Conservation des souches

La conservation des souches se fait dans des tubes contenant 10 mL de gélose à l'extrait de malt à l'eau de mer : extrait de malt (Laboratoires AES, Combourg, France, référence AEB 171256) 4 g ; eau de mer naturelle stérile qsp 1 L ; agar-agar 15 g ; pH $5,7 \pm 0,2$.

Après leur l'autoclavage (120°C pendant 20 min), les tubes sont soit inclinés, pour obtenir des tubes de Sabouraud en pente (pour la conservation à température ambiante ou au froid), ou bien laissés en position verticale pour préparer des tubes de Sabouraud en culot (pour la conservation sous paraffine).

Les souches pures sont codées (code MMS, mycothèque marine du SMAB) et conservées dans la mycothèque du laboratoire SMAB.

En fonction des besoins, 3 modes de conservation sont utilisés au sein du laboratoire.

1-5-1 Conservation de très longue durée en cultures congelées

La souche cultivée sur une pente de gélose est congelée à -24°C . Cela permet une conservation de longue durée, jusqu'à une dizaine d'années, et l'échantillon est directement utilisable pour relancer les cultures.

1-5-2 Conservation de longue durée sous huile de paraffine

Lorsque la souche s'est suffisamment développée sur un culot de gélose en tube, elle est recouverte de quelques millilitres d'huile de paraffine stérile, pour une conservation jusqu'à 5 années à température ambiante.

1-5-3 Conservation de courte durée à température ambiante

La culture sur une gélose inclinée est laissée à température ambiante, ce qui entraîne son dessèchement 2 à 3 semaines par la suite. Les souches sont ainsi directement disponibles mais durant quelques semaines seulement.

1-6 *Identification taxonomique des souches par microscopie optique*

L'identification morphologique des *Trichoderma* sp. s'est faite par observation microscopique des lames préparées selon « la technique du drapeau » de Roth. Un petit morceau de papier adhésif transparent est accroché sur la pointe d'une pipette Pasteur. Sa face adhésive est déposée sur la surface de la colonie fongique en culture en boîte de Pétri. Ce contact permet de prélever du mycélium et des spores. La face adhésive du papier est ensuite appliquée sur une lame. Pour augmenter le contraste, une goutte de colorant (du bleu coton par ex.) peut être déposée sur la lame juste avant d'y accoler le papier adhésif (Sallenave, 1999).

1-7 *identification taxonomique des Trichoderma sp. par la Methode de J. Bissett*

Cette méthode est basée sur des protocoles internes de référence. L'examen est morphologique puis métabolique et enfin phylogénétique.

1-7-1 Examen morphologique

Les cultures sont réalisées sur les milieux Oxoid™ malt extract agar (MA) à 2% et Oxoid™ potato dextrose agar (PDA). L'incubation a lieu à 20°C sous lumière naturelle ou artificielle avec 24/24 h en temps d'exposition.

Les lames sont préparées à l'acide lactique. L'observation vise, d'une part, la structure et morphologie des conidiophores âgés de 4-7 jours. D'autre part, les conidies âgées de 14 jours sont également considérées, observées et mesurées.

Cette identification préliminaire est basée sur des comparaisons avec des données descriptives dans la littérature taxonomique récente (Grams et Bissett, 1998).

1-7-2 Examen métabolique

Cet examen consiste à suivre l'assimilation du carbone et l'activité mitochondriale sur des plaques Biolog FF MicroPlates™, comprenant 96 puits contenant différents substrats carbonés en plus d'un témoin blanc.

L'oxydation du carbone par les mitochondries est suivie par le dosage des produits de réduction résultant du cycle de l'acide citrique. Le révélateur colorimétrique est l'iodonitrotétrazolium violet (INT) qui, en présence du fumarate produit par le champignon, est réduit en formazan rouge avec une absorbance UV à 490 nm. L'accumulation du formazan est mesurée quantitativement par des méthodes spectrophotométriques.

Les résultats sont comparés à une base de données de plus de 1000 souches de *Trichoderma* sp. Des analyses statistiques étudient les variations métaboliques entre les espèces et comparent les profils métaboliques des souches très apparentées morphologiquement.

1-7-3 Examen phylogénétique et séquençage de l'ADN

L'ADN est extrait du mycélium à l'aide de kits UltraClean™. L'ADN ribosomique contenant les espaceurs transcrits internes (ITS⁷, *internal transcribed spacer*) ITS1 et ITS2 ainsi que le gène ARNr 5.8S sont isolés, amplifiés par PCR⁸ puis séquencés.

La comparaison des séquences d'ADNr avec des séquences de référence classées en base de données, à l'aide de l'outil informatique, permet une identification précise et complémentaire des souches.

⁷ Les ITS sont des régions non-codantes présentes dans l'ADN. Elles espacent les gènes ribosomiques codants 18S, 5.8S et 28S, très conservés chez les espèces. Cette caractéristique rend facile la localisation et l'accès aux ITS à l'aide des amorces (primers). Les ITS sont spécifiques de l'espèce et ont été utiles pour distinguer taxonomiquement les espèces difficilement identifiables (Balshovskiy, 1997).

⁸ La réaction de polymérisation en chaîne (PCR, *polymerase chain reaction*) est une méthodologie récente (10 ans) qui permet d'amplifier, de manière sélective et rapide, une séquence nucléotidique pour en produire de grandes quantités de répliques (des milliards, typiquement) en partant juste d'un fragment d'ADN la contenant.

La PCR est basée sur l'utilisation d'ADN polymérase pour copier une matrice d'ADN, grâce à des cycles répétés de réplication. L'enzyme est orientée vers la séquence à recopier par une courte amorce d'oligonucléotides hybridés à la matrice d'ADN au début et à la fin de cette séquence désirée. Les amorces sont synthétisées chimiquement et fournissent une amorce pour la réplication de l'ADN sur chaque brin bicaténaire initial (Alberts *et al.*, 1999).

1-8 fermentation pour la production des peptaïbols

Nous avons utilisé 2 modes de fermentation différents, le premier en milieu liquide et le second de consistance solide.

Pour chacun des milieux, nous avons utilisé une méthode adéquate pour l'ensemencement des conidies de *Trichoderma* sp.

1-8-1 Fermentation liquide

Les spores sont produites par des colonies de *Trichoderma* sp. cultivées sur gélose à l'extrait de malt à l'eau de mer (cf. paragraphe 1-5 de ce chapitre) en fioles de Roux incubées durant 2 semaines à 27°C.

La récupération des spores se fait par addition d'eau de mer stérile et de Tween 80 aux cultures fongiques. Cet émulsifiant favorise le mouillage des phialospores, pour mieux les décrocher des hyphes mycéliens.

Après filtration sur gaze, les spores sont dénombrées dans les filtrats (par comptage sur cellule de Malassez).

Le milieu fermentaire dit "de référence" est celui préconisé par Kohlmeyer et modifié (KM) par Landreau (2002). Sa concentration en glucose est doublée et son pH est modifié : glucose (Merck, Darmstadt, Allemagne, référence 1.08342.2500) 10 g ; MgSO₄ 7 H₂O (Prolabo, Fontenay sur Bois, France, référence 25 162.361) 2,4 g ; NH₄NO₃ (Merck, Darmstadt, Allemagne, référence 1.01187.1000) 2,4 g ; tampon Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris) (Prolabo, Fontenay sur Bois, France, référence 28 812.232) 1,21 g ; eau de mer naturelle stérile qsp 1 L ; pH 6,3 ± 0,2. Il est réparti dans des flacons avec un volume final de 150 mL avant d'être stérilisé par autoclavage à 110°C pendant 30 min et non pas à 120°C pendant 20 min, pour éviter la dénaturation de la gélose.

Les suspensions de spores sont diluées à la concentration finale de 5 millions de spores/mL pour l'ensemencement standardisé des flacons de milieu KM.

1-8-2 Fermentation solide

Le milieu KM peut être solidifié (KMS) en y ajoutant 15 g d'agar-agar. Porté d'abord à ébullition, il est réparti dans des fioles de Roux (150 mL/fiole) avant d'être stérilisé par autoclavage (110°C pendant 30 min).

L'ensemencement de ce milieu se fait par la technique des implants. A l'aide d'un emporte pièce stérile, des implants mycéliens (1 cm Ø) sont préparés sur le pourtour de colonies fongiques cultivées sur gélose à l'extrait de malt à l'eau de mer (cf. paragraphe 1-5 de ce chapitre) dans des boîtes de Pétri (10 cm Ø) incubées 1 semaine à 27°C.

2- TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT

2-1 Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Matériel chromatographique

Plaques CCM 20 x 20 cm x 0,20 mm de gel de silice, ALUGRAM® SIL G/UV 254 Macherey-Nagel (Düren, Allemagne)

Solvant de migration CHCl₃/MeOH 70:30 v:v

Dépôt des échantillons 0,4 à 0,5 mg d'échantillon sont déposés à l'aide de capillaires en verre gradués.

Révéléteur au TDM (4,4' tétraméthyl-diamino-diphényl méthane, réactif usuel des peptaïbols)

Réactif 1 solution d'hypochlorite de sodium à 13% de chlore actif.

Réactif 2 : solutions A (60 mL) + B (100 mL) puis ajout de 1,5 mL de la solution C.

Solution A : 2,5 g de 4, 4' tétraméthyl-diamino-diphényl méthane dans 10 mL d'acide acétique glacial, le tout dilué dans 50 mL d'eau.

Solution B : 5 g d'iodure de potassium dans 100 mL d'eau.

Solution C : 0,3 g de ninhydrine dans 90 mL d'eau et ajout de 10 mL d'acide acétique glacial.

La plaque développée est séchée dans une étuve à 100°C pendant 15 min, puis pulvérisée du réactif 1, sans excès. Après un nouveau séchage de 10 min, une légère pulvérisation de la plaque avec le réactif 2 suffit pour mettre en évidence la présence de peptaïbols sous forme de taches d'abord vertes, puis bleues vertes et enfin noires durant quelques heures.

Le réactif peut être conservé un mois à température ambiante et à l'abri de la lumière (Von Arx, *et al.*, 1976 ; Brückner *et al.*, 1983 ; 1985 ; Landreau, 2001).

Révélateur à l'orthotolidine (révélateur de liaisons amine)

Une solution de 160 mg d'o-tolidine dans 30 mL d'acide acétique glacial, complétée à 500 mL avec H₂O et additionnée de 1 g d'iodure de potassium.

Après migration, la plaque est séchée puis introduite dans une cuve en atmosphère saturée en chlore (permanganate de potassium à 1,5% + HCl 10%) pendant 15 à 20 min puis 10 min à l'air libre (élimination de l'excès de chlore) et enfin vaporisée du réactif orthotolidine.

L'apparition de taches violettes, visibles à l'œil nu, indique la présence de peptides.

2-2 Chromatographie Liquide Basse Pression (VLC, vacuum liquid chromatography)

Citée la première fois par Call *et al.* (1977), la chromatographie liquide basse pression (VLC) est un mode chromatographique simple, rapide, efficace et peu coûteux. Elle fournit un moyen de prétraitement idéal pour les produits destinés à la CLHP. La VLC est couramment utilisée pour la séparation de produits naturels et s'effectue sur colonne de verre, au bas de laquelle est appliquée une dépression pour accélérer le débit d'élution. La phase stationnaire peut être aussi bien polaire, qu'apolaire. Après mise en suspension dans un solvant adéquat, la phase stationnaire est déposée dans une colonne de dimension appropriée, au fond de laquelle un filtre en laine de verre a été déposé, puis tassée et séchée par application du vide. L'échantillon peut être alors déposé délicatement à la surface de la phase stationnaire (Targett *et al.*, 1979 ; Pelletier *et al.*, 1986 ; Petit, 2003).

L'élution se fait par paliers.

Appareillage chromatographique et conditions opératoires

Masse d'échantillon : 200 mg

Colonne en verre 2 cm Ø, 14 cm de long

Phase stationnaire : gel Silice Diol Nucleoprep 100-30 OH (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne), 10/1 masse Silice/masse de l'échantillon

Eluant : CH₂Cl₂/EtOH

Nombre de fractions : 3, nommées A, B et C

Pourcentage d'EtOH, volume des fractions :

Désignation de la fraction	A	B	C
% EtOH dans CH ₂ Cl ₂	2	10	15
Volume des fractions (mL)	200	35	35

Un filtre en laine de verre est tassé au fond de la colonne.

2-3 Chromatographie Liquide À Haute Performance (CLHP)

La faible granulométrie qui caractérise la CLHP lui confère son haut pouvoir résolutif. Cette séparation repose sur la différence d'affinité des composés entre deux phases, la phase stationnaire (contenue dans la colonne chromatographique) et la phase liquide ou mobile, constituée par un solvant ou un mélange de solvants. Les composés sont alors soumis à un effet d'entraînement par la phase mobile et à un effet de rétention par la phase solide. La phase liquide est poussée dans la colonne par l'application d'une pression élevée *via* une pompe (Fig. 16), ce qui accélère la migration des substances. Le temps que met une substance à parcourir la colonne depuis l'injecteur jusqu'au détecteur est appelé temps de rétention (t_R) et rend compte de sa polarité. Les phases stationnaires peuvent être polaires ou apolaires. Les phases polaires sont constituées de gels de silice (colonne silice) ou de silice greffés par des groupements organiques polaires, l'éluant utilisé alors est peu polaire, et les produits sont élués dans l'ordre croissant de leur polarité. La chromatographie en phase inverse (RP pour *Reversed Phase*) combine des phases apolaires et des solvants polaires. Ici, l'éluion se fait par polarité décroissante. Les phases apolaires sont constituées de gels de silice greffée par des groupements hydrocarbonés (chaîne octadécyl C₁₈, octyl C₈, butyl C₄,...) (Petit, 2003).

La CLHP préparative utilise des colonnes de diamètres plus importants, elle consomme beaucoup de solvant, mais permet la séparation de quantités importantes de produits.

Les détecteurs matérialisent l'éluion et la séparation des composés sous forme de pics. La hauteur et la surface des pics sont proportionnelles à l'absorbance du produit et secondairement à sa concentration.

Une bonne séparation par CLHP est basée sur la qualité des chromatogrammes enregistrés (pics symétriques de type gaussien et suffisamment séparés pour éviter le recouvrement) et sur la durée de séparation. Dans le cas de la CLHP préparative, s'ajoute le facteur quantité.

Appareillage et matériel chromatographique

Pompe à solvant : Constrametric III (LDC/Milton Roy)

Injecteur : Rheodyne type 7152

Détecteur : SpectroMonitor D (LDC) UV

Imprimante : BBC Goerz Metrawatt SE 120

Atténuation : de 0,05 à 0,1

Seringue : 10, 100 et 500 μ L (Hamilton)

Acide acétique : Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Allemagne.

Conditions CLHP

Analytique

Colonne : phase C18, Inertsil ODS 3-4, 6x250 mm

Solvant : MeOH/eau/acide acétique 85:15:0.05 v:v

Débit : 1 mL/min

Pression : 2000 PSI

Détecteur UV : 220 nm

Masse de l'échantillon : de 0,01 à 0,1 mg

Volume de l'injection : 10 μ L

Préparatif

Colonne : phase C18 Inertsil ODS 3 ; 5 μ m, 10 x 250 mm (Interchim, France)

Solvant : MeOH/eau/acide acétique 85:15:0,05 v:v

Débit : 5 mL/min

Pression : 1500 PSI

Détecteur UV : 220 nm

Masse de l'échantillon : de 1 à 7 mg

Volume de l'injection : 200 μ L

Vérification des colonnes au bistramide A :

A une concentration de 10 mg/mL, un volume d'injection de 10 μ L élué avec un mélange MeOH/eau 15:85 v:v à un débit de 1 mL/min, le t_R du bistramide A (produit de référence du laboratoire) est de 14 min.

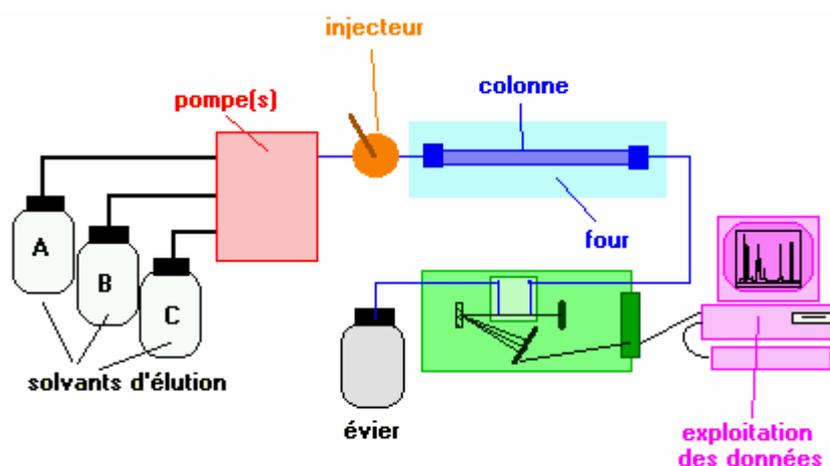


Fig. 16 : Schéma de l'appareillage de la CLHP
(http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/chrom_06.htm).

3- TECHNIQUES D'IDENTIFICATION STRUCTURALE

3-1 La Spectrométrie de Masse (SM)

Initialement appliquée à l'étude d'isotopes stables, la SM a été introduite dans la chimie (Conrad, 1930) puis dans de nombreuses autres disciplines (recherche spatiale, étude des matériaux...). Son application à l'étude de composés biologiques est relativement récente (Grayson, 2003).

Jusqu'à la fin des années 70, la SM concernait les molécules volatiles de faibles masses moléculaires. Mais au début des années 80, les deux techniques MALDI et ESI révolutionnent l'étude des biopolymères. Aujourd'hui, la SM est une approche quasi incontournable dans l'étude et la caractérisation des biomolécules comme les peptides et les protéines (Fig. 17). En dix ans elle est devenue la technique de choix pour l'étude des biopolymères (Vinh, 1999). D'un point de vue général, les techniques d'ionisation MALDI (*matrix assisted lazer desorbtion ionization*) et l'ESI (*electro spray ionisation*) commencent peu à peu à remplacer les méthodes classiques du séquençage peptidique (Cole, 1997 ; Kazmi et Krull, 2001).

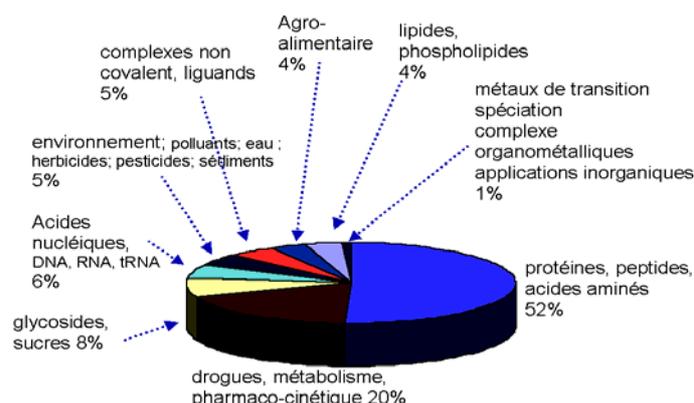


Fig. 17 : applications de la ESI-SM en protéomique et chimie combinatoire (basé sur 5843 publications) (<http://www.forumlabo.com/2002/abstracts/2002/27perspec.htm>).

3-1-1 L'analyse des peptaïbols par SM

La spectrométrie de masse (SM) est une technique d'analyse des ions en phase gazeuse à basse pression. Elle permet de déterminer la masse d'une molécule en mesurant son rapport m/z (masse de la molécule sur le nombre de charges) (Genin, 1995 ; Rouessac et Rouessac, 1996).

L'appareil que nous avons utilisé pour le séquençage des peptaïbols est un spectromètre de masse LCQ™ de marque ThermoFinnigan™ de type ESI-IT (*electro spray ionisation-ion trap*). Cet appareillage est bien adapté aux séquençages des peptaïbols car il permet :

- L'ionisation simple des peptides et des protéines
- La détermination des masses moléculaires élevées : la portée m/z limitée à 2000 Th suffit pour mesurer une masse moléculaire 50 fois plus importante. En effet, la formation d'espèces multichargées (multi-protonées) permet (en première approximation) de diviser la masse réelle de la molécule par le nombre de charges qu'elle porte et ainsi de baisser la valeur du rapport m/z de l'ion qui devient ainsi visible sur la spectre (Biemann, 1992).

Ce spectromètre est constitué de 4 parties principales (Fig. 18) :

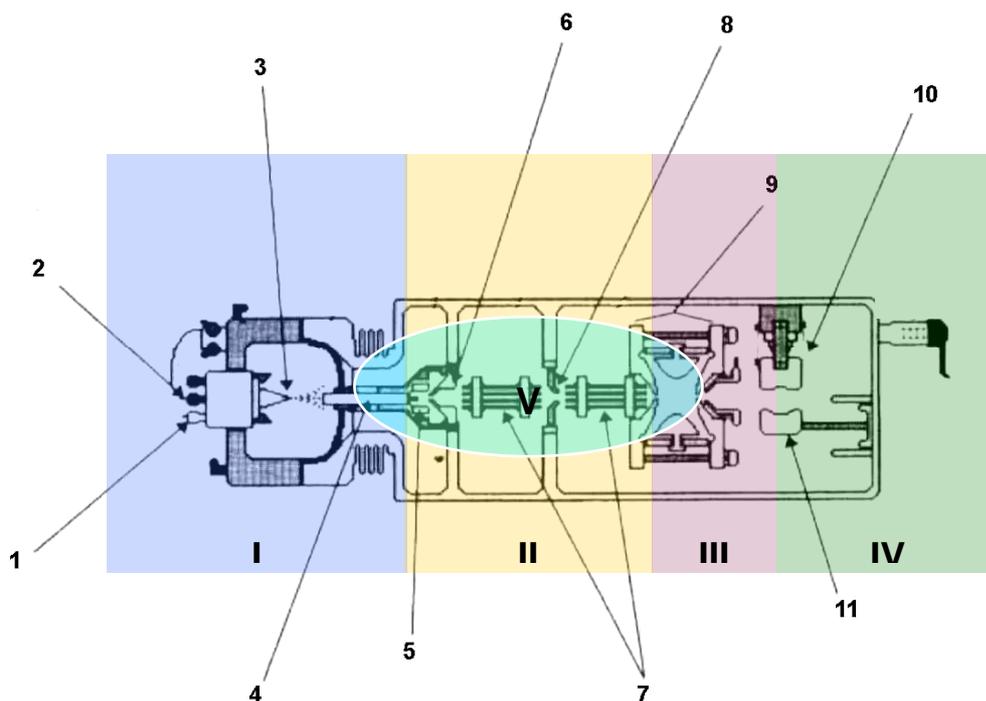
I - Une source d'ions par électrospray (ESI) munie d'un système d'introduction d'échantillons (Fig. 19). Le nom de la source détermine celui de l'appareil. C'est ici que sont ionisées les molécules de l'analysat.

II - Une interface de conduction et d'introduction des ions. A ce niveau les ions sont accélérés par l'application d'une ddp (différence de potentiel).

III – Un système dispersif, analyseur à trappe d'ions (IT) (Fig. 21), qui est le spectromètre de masse et qui sépare les ions en fonction du rapport m/z .

IV - Un détecteur, relié à une station de travail (de type Xcalibur) pour l'archivage informatique et le traitement des spectres de masse obtenus, complète le dispositif.

Le vide est créé dans le spectromètre à l'aide d'une turbo-pompe et la pression décroît de la partie II (Fig. 18) à la partie IV de 1 Torr à 1.10^{-3} Torr.



I : source

II : interface de conduction et d'introduction

III : système dispersif, analyseur à trappe d'ions

IV : détecteur

V : optique de transfert

1- introduction des échantillons

2- introduction du gaz vecteur

3- aiguille du spray

4- capillaire chauffé

5- « Tube Lens »

6- cône d'extraction

7- octapoles

8- lentille inter octapoles

9- analyseur à trappe d'ions

10- multiplicateur d'électrons

11- dynode

Fig. 18 : Présentation du spectromètre de masse LCQ®
(Document technique ThermoFinnigan™ ; Cole, 1997).

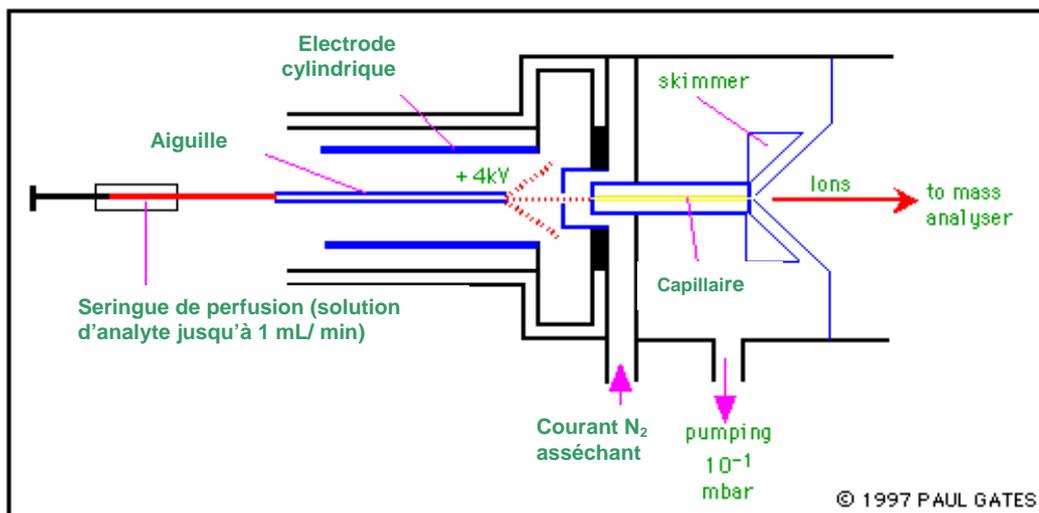


Fig. 19 : Schéma d'une source ESI
 (<http://www-methods.ch.cam.ac.uk/meth/ms/theory/esi.html>).

3-1-2 L'ionisation des peptides par l'électro-nébulisation

L'ESI est un mode d'ionisation à pression atmosphérique (API, *atmospheric pressure ionisation*) présenté pour la première fois en 1988 par Fenn J.B. (université Virginia Commonwealth de Richmond, Virginie, USA) (Watson, 1985). Il permet d'ioniser de très grosses molécules en phase liquide en induisant très peu de fragmentations. Cette technique est bien adaptée aux analyseurs à trappe ionique qui sont capables de détecter le flux ionique continu, d'autant plus qu'elle rend possible l'interface entre une technique de séparation chromatographique (CLHP) et le spectromètre de masse, ce qui explique la diversité de ses applications (Fig. 17) (Auvin, 1999 ; Enjalbal *et al.*, 2000).

L'Electro-nébulisation ou *electro spray ionisation* (ESI) (Fig. 19) a lieu au niveau de la source de l'appareil. Grâce à cette technique douce, la molécule ionisée arrive intacte sur le détecteur (elle n'a pas ou peu subi de collisions qui auraient pu la fragmenter), ce qui génère des molécules protonées d'un faible taux d'excédent énergétique, les rendant ainsi relativement stables et permettant la détermination de leur masse moléculaire, même au sein d'un mélange (Rouessac et Rouessac, 1996).

L'échantillon en solution peut être admis dans la source par infusion directe (à l'aide d'une pompe à seringue) ou par couplage CLHP. Les débits sont alors compris entre 1 μL à 1 mL/min. L'échantillon en solution (Fig. 20) arrive ainsi à l'extrémité d'un capillaire porté à potentiel électrique élevé. Sous l'influence de ce champ intense, la solution est nébulisée (formation d'un nuage de gouttelettes chargées, un spray).

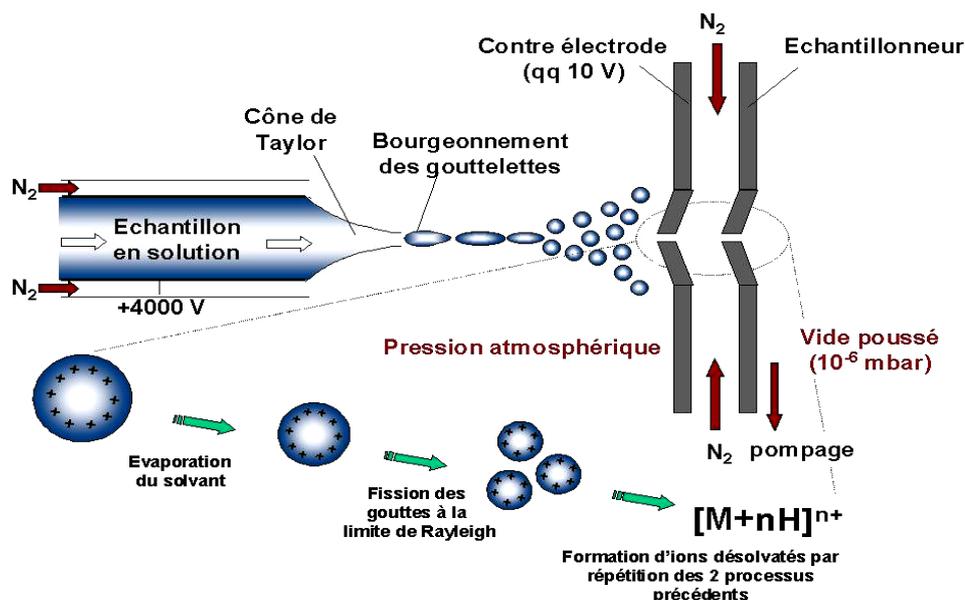


Fig. 20 : Schéma de l'ionisation par électronébulisation, cas de l'électrospray
(http://www.cjasm.espci.fr/cjasm_fiche_esi.html).

Ces gouttelettes traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Durant ce transport, la taille des gouttelettes diminue par évaporation du solvant (sous un flux de gaz chauffé puis par action du vide) et par explosions coulombiennes successives (la répulsion électrostatique des charges du même signe en surface des gouttes les fait exploser en gouttelettes). Un flux de gaz (généralement de l'azote) est appliqué à l'interface (qui parfois est chauffée) pour aider à l'évaporation du solvant. Les ions ainsi formés (cationiques ou anioniques) sous pression atmosphérique sont canalisés par un ensemble d'orifices sous pompage, vers l'analyseur où règne un vide poussé croissant (Genin, 1995 ; Sommerer, 1996 ; Cole, 1997 ; Vinh, 1998 ; Niessen, 1999).

3-1-3 L'analyse des ions générés dans la source

L'analyseur quadrupôle à trappe d'ion (ou à piégeage d'ions, *Quadrupole Ion-Trap Analyser*) (Fig. 21) est tridimensionnel. Il est constitué d'une électrode annulaire (cylindre creux) sur laquelle un champ quadrupolaire est appliqué ainsi que de 2 électrodes chapeau, comprenant chacune un orifice, l'une permet l'entrée des ions et la seconde leur sortie. Pour stabiliser la trajectoire des ions dans la trappe, une pression d'hélium est appliquée (0,1 Pa). En variant l'intensité du courant au niveau de l'électrode, il est possible de sélectionner les ions en fonction de leur rapport m/z et de les maintenir dans la trappe pour les fragmenter (Niessen, 1999).

Les spectres ESI-MS obtenus représentent un ensemble de pics correspondants aux ions multichargés de type $[M+nH]^n$ où M est la masse moléculaire et n le nombre des charges porté par la molécule (Vinh, 1999 ; Degenkolb *et al.*, 2003).

L'analyseur contient donc un ensemble d'ions multichargés $[M+nH]^{n+}$, $[M+(n+1)H]^{(n+1)+}$, etc., et la résolution de ce système à 2 équations à 2 inconnues (la charge et la masse) permet déjà de calculer la masse des molécules analysées. Il est possible de mesurer des masses moléculaires de l'ordre de 100.000 Da (Sommerer, 1996).

A ce stade, la détermination structurale est impossible et une énergie supplémentaire est alors requise pour la fragmentation de l'ion moléculaire (qui se fait le plus souvent par collision avec une petite molécule neutre, en l'occurrence l'hélium). Ces fragments « spécifiques de la structure », ainsi formés sont analysés par SM à piégeage successif d'ions (SM^n) (Biemann, 1992) qui, grâce à l'IT, peut être de plus de 10 générations d'ions fils (Degenkolb *et al.*, 2003).

La technologie de l'IT- MS^n (piégeage successif d'ions dans la trappe ionique), permet de sélectionner, isoler et enfin réactiver un ion par Collisions avec un gaz rare (l'hélium), Induisant des Dissociations, d'où le terme CID (*collision induced dissociation*). L'énergie cinétique de collision est convertie en énergie interne et provoque la fragmentation de l'ion dit parent en ions fils (MS^2) qui sont éjectés de la trappe. Le même procédé peut être appliqué à ces derniers, pour générer des ions de deuxième génération (MS^3), et ainsi de suite. Dans certaines conditions, ce processus MS^n peut être répété plusieurs fois où n peut atteindre 10 (<http://www.ibsm.cnrs-mrs.fr/ifrc/servtech/seq/spectromasse.html>).

La trappe d'ions permet de choisir le nombre optimal d'ions entrant, afin de favoriser la sensibilité et la résolution, ce procédé est appelé "zoom scan" (Cole, 1997).

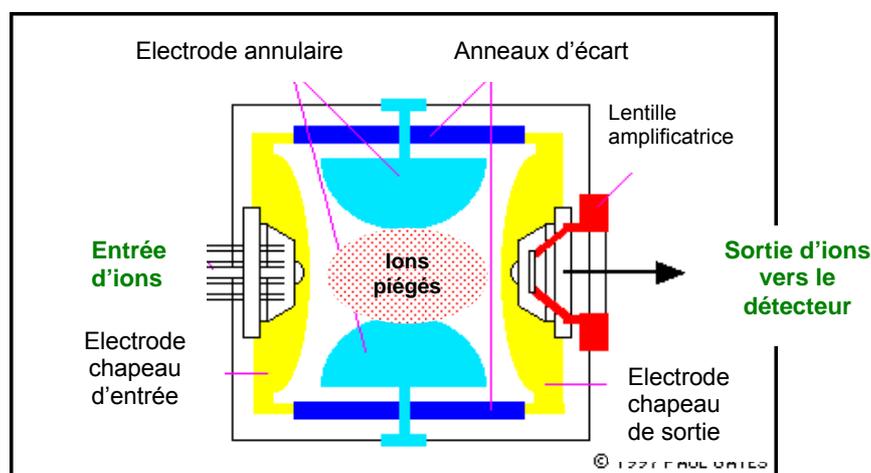


Fig. 21 : Les composants de base d'une trappe à ions (d'après Gates, 1999).

3-1-4 Conditions expérimentales utilisées pour l'analyse SM

Les échantillons à analyser sont repris dans un mélange d'acétonitrile (CH_3CN)/eau 75:25 v:v à la concentration de $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Le CH_3CN utilisé est de qualité CLHP (Baker, Deventer, Holland) et l'eau distillée à partir d'un système Milli-Q[®] Synthesis (Millipore, Billerica, MA, USA).

Pour l'acidification du milieu nous avons utilisé de l'acide trifluoroacétique (TFA, Fluka Chemical, Buchs, Suisse).

L'analyse a été effectuée en perfusion directe à l'aide de microseringues de 250 et 500 μL (Hamilton, Reno, Australie) avec un débit de $3 \mu\text{L}/\text{min}$.

Les paramètres techniques de l'analyse MS utilisés lors de ce travail figurent sur le tableau 3.

Tableau 3 : Conditions SM utilisées pour l'analyse des peptaïbols

Source ESI	Analyseur à trappe d'ion
Mode d'ionisation : positive	Full-MS/Full MS ² / Full MS ³ / Full MS ⁴
Débit du gaz vecteur (N ₂) : 90 AU (unités arbitraires)	Echelle du Full MS (m/z) : 150-2000
Gaz auxiliaire (N ₂) : 0 AU	Nombre de microscans : 3
Voltage du spray : 3 kV	Temps d'injection maximal : 50 ms
Courant du spray : 3,76 µA	Energie de collision : 22%
Température du capillaire : 157 °C	Temps d'activation : 30 ms
Voltage du capillaire : 9,07 V	Fenêtre d'isolation : 3-5 (m/z)
	Full MS Target : 5.10 ⁷
Système de transmission optique	Full MS ⁿ Target : 2.10
Voltage des lentilles : -16 V	Voltage du multiplicateur d'électron (set point) : -1200
Voltage de l'octapole 1 : -3 V	
Voltage de l'octapole 2 : -16 V	
Amplitude interoctapole : 400 V (de pic en pic)	

3-2 La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à impact électronique (CPG-SM-IE)

La CPG (Figs. 22 et 23) couplée à la SM est une technique sensible et rapide introduite dans l'analyse des peptides toxiques dans les années 1970 (Betina, 1989) et qui est couramment utilisée de nos jours (Brückner *et al.*, 1987a). Son principe repose sur la différence du temps de rétention (t_R) entre les AA (même isomériques) (Wada *et al.*, 1995 ; Brückner *et al.*, 2002b).

Le chromatographe en phase gazeuse utilisé dans notre travail est du type Agilent 6890 Gas Chromatograph équipé d'un passeur d'échantillons Hewlett-Packard 7673A Liquid Autosampler, d'un système d'introduction sans fuite Splitless Capillary Inlet System et d'une colonne capillaire OPTIMA[®] 5 MS (5% Diphenyl-95% Dimethylpolysiloxane) (30 m × 0.25 mm d.i., 0.25 µm d'épaisseur du film) (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne).

La détection se fait à l'aide d'un spectromètre de masse en mode d'ionisation par impact électronique SM-IE muni d'un analyseur à filtre quadripolaire (Hewlett-Packard 5973 Mass Spectrometer in EI Mode) en full-scan à 70 eV, couplé directement au chromatographe.

Les deux paragraphes suivants (3-2-1 et 3-2-2) expliquent brièvement le principe de l'ionisation par impact électronique et celui de l'analyseur quadripolaire.

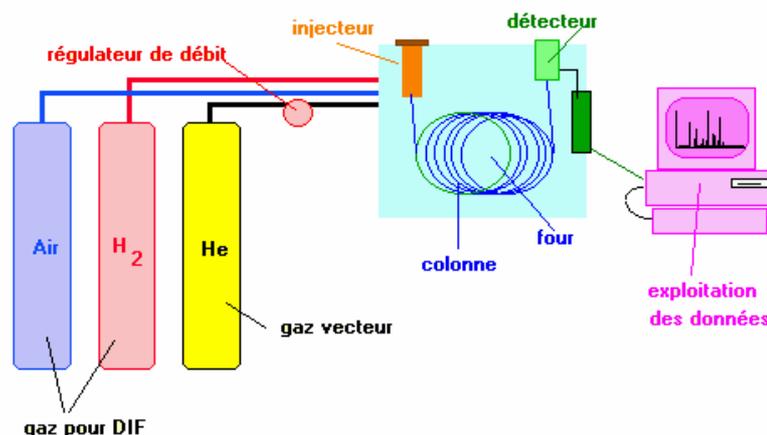


Fig. 22 : Schéma de l'appareillage de la CG (http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/chrom_02.htm).

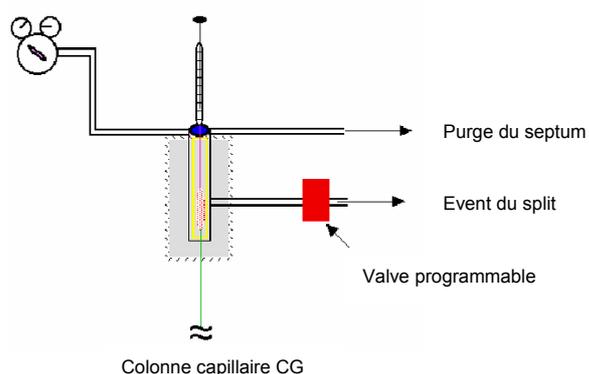


Fig. 23 : Schéma d'un injecteur capillaire pour CG (mode split/splitless) (<http://www.shsu.edu/~chemistry/GC/GCinject.html>).

3-2-1 L'ionisation par impact électronique (IE)

Ce mode d'ionisation est le premier procédé utilisé en SM et reste le plus documenté et le plus largement utilisé pour l'analyse des molécules relativement volatiles. Ce procédé permet d'obtenir des ions moléculaires et des ions fragments typiques de la molécule analysée, fournissant des informations structurales. Ses avantages sont la possibilité de couplage à la CLHP et la CPG ainsi que son application pour quasiment tous les produits volatils thermostables. La masse maximum détectée, inférieure à 1000 Da, constitue son inconvénient majeur.

L'ionisation est réalisée dans une enceinte où règne un vide de 10^{-9} à 10^{-7} Torr. La substance à analyser est introduite à l'état gazeux au voisinage d'un faisceau d'électrons accélérés. Ces électrons sont pour la plupart des cas produits à partir de filaments de rhénium ou de tungstène portés électriquement à haute température (2000°C). Ils sont ensuite accélérés par une ddp (généralement de 70 V) et constituent ainsi un courant d'ionisation d'une énergie standard de 70 eV. La présence d'un faible champ magnétique près du filament oblige ces électrons à adopter un parcours hélicoïdal en migrant vers une trappe opposée au filament où ils finissent par être recueillis. Ce phénomène augmente la probabilité de collision des électrons avec les molécules de l'analysat surtout que la distance entre le filament et la trappe d'électrons est très réduite (15-20 mm). La collision provoque le plus souvent un départ d'électrons des molécules à analyser formant ainsi des cations qui seront orientés vers l'analyseur à l'aide des lentilles d'extraction (plaques accélératrices) (Watson, 1985 ; Rouessac et Rouessac, 1996 ; Niessen, 1999 ; Lafont, 2005).

3-2-2 L'analyseur à filtre quaripolaire

L'analyseur quadripolaire (Fig. 24) est constitué de deux paires d'électrodes métalliques sous forme de barres à section en partie hyperbolique. Sur l'une des paires est appliqué un voltage positif et sur l'autre un voltage négatif. Il est également appliqué aux 4 électrodes une combinaison de voltage direct (*VDC*) et alternatif (*VRF*). En raison des forces électriques alternatives (attractives et répulsives), les ions provenant de la source oscillent entre les électrodes. Les électrodes maintenues à voltage positif filtrent les ions de haute masse et quand elles sont à voltage négatif, elles filtrent les ions de basse masse. Pour une amplitude donnée des voltages *VDC* et *VRF*, seuls les ions ayant un rapport *m/z* spécifique, auront une trajectoire stable et seront transmis par le

quadrupole vers le détecteur, tandis que les autres ions seront déstabilisés et dépourvus de trajectoires stables.

Parmi les avantages d'un analyseur quadripolaire :

- taille compacte
- bas potentiel pour la source
- temps de balayage de la plage de masse très réduit
- haut niveau de transmission des ions.

Comparé à un spectromètre magnétique, sa plage de masse et son pouvoir de résolution sont beaucoup plus modestes, ce qui représente sa principale faiblesse (Watson, 1985 ; Rouessac et Rouessac, 1996 ; Niessan, 1999 ; Badea et Thibault, 2004).

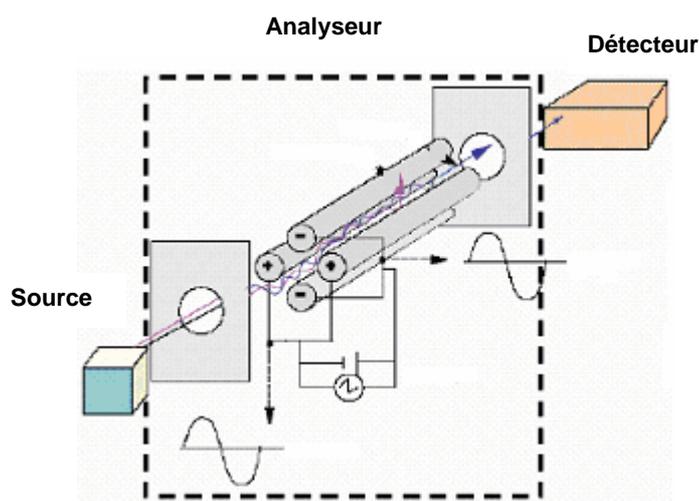


Fig. 24 : Représentation schématique d'un analyseur quadripôle (Badea et Thibault, 2004).

3-2-3 Méthodologie de l'analyse

Au départ, nous avons établi une liste de t_R de référence en utilisant des AA purs pour pouvoir disposer de standards pour l'analyse des AA isomériques des peptaïbols.

Par la suite, nous avons hydrolysé les peptaïbols à analyser pour libérer les AA, puis nous les avons transformé en dérivés *N*-trifluoroacétylisopropylesters (EITA) pour les rendre volatiles (El Hajji *et al.*, 1987 ; Betina, 1989), aussi bien pour les AA résultant de l'hydrolyse que pour les AA de référence.

L'analyse dépend d'un programme de chauffage et de paramètres adaptées.

Solutions standards

Les solutions d'AA purs (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France ; Acros Organics, Noisy-Le-Grand, France) sont diluées dans du MeOH à une concentration de 1 mg/mL. La solubilité de ces AA dans le MeOH est très variable, c'est la raison pour laquelle on utilise une agitation au Vortex pour favoriser la dissolution.

L'hydrolyse des peptaïbols

Une prise d'essai de 2 mg d'extrait est séparée par CLHP et les fractions sont transvasées dans des flacons (pour un volume final de 100 µL). Après évaporation du solvant (CH₂Cl₂), les flacons sont introduits dans un tube-enceinte au fond duquel sont déposés 100 µL d'HCl 6N. Hermétiquement fermé et vidé d'air, ce tube est introduit dans le four de la Pico-Tag Station (Waters, USA) à 100°C pendant 24 h. L'acide est ensuite chassé du tube à l'aide d'un vide d'air (Dib *et al.*, 1998 ; Fik *et al.*, 2000 ; Atanassova *et al.*, 2003).

Préparation des dérivés *N*-trifluoroacétylisopropylesters

La dérivation

La dérivation des AA se déroule en 2 étapes, l'estérification suivie d'une trifluoroacétylation (Fig. 25).

L'estérification de la fonction acide

Les hydrolysats issus de la prise d'essai (2 mg) sont mis dans des flacons à sertir puis additionnés de 100 µL d'une solution anhydre d'HCl 3 N dans le 2-propanol. Après

sertissage avec des bouchons à septum central, les flacons sont chauffés à 100°C pendant 20 min pour obtenir des esters d'acides aminés 2-isopropyliques.

La N-trifluoroacétylation de la fonction amine

Cette réaction s'obtient en ajoutant aux esters d'AA 50 µL d'acide trifluoroacétique anhydre (TFAA, Macherey-Nagel, Hoerd, France, référence 701130.510). Cette quantité, limitée pour éviter l'éclatement du flacon, est largement suffisante pour la réaction. Les flacons sont de nouveau sertis et chauffés à 100°C pendant 10 à 20 min. Après refroidissement à température ambiante, les esters isopropyliques N-trifluoroacétyl aminoacides (EITA) obtenus sont débarrassés de l'excès de réactif par évaporation. A l'aide de 100 µL de CH₂Cl₂, les EITA sont repris dans des flacons à sertir. Lors de ce transfert, l'utilisation du MeOH est fortement déconseillé au risque de dégrader la dérivation (Bodo *et al.*, 1985 ; Rebuffat *et al.*, 1995, www.uvm.edu/~dmatthew/chem201/chem201_GCMS_lab.pdf).

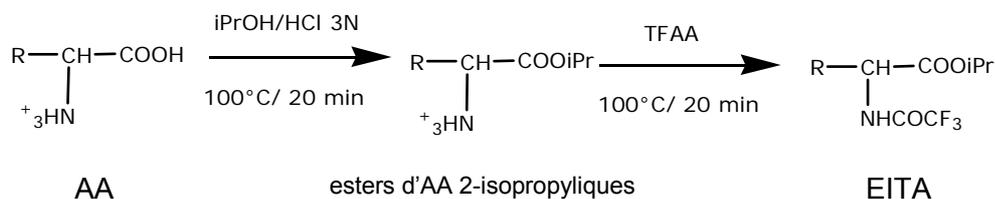


Fig. 25 : Formation des dérivés volatils d'AA (Hlimi, 1997).

3-2-4 Séparation chromatographique des N-trifluoroacétylisopropyl esters (EITA)

Le gaz vecteur est l'hélium avec une pression d'entrée de 2,48 psi. Le passeur d'échantillon, utilisé en mode splitless est paramétré de façon à rincer la seringue d'injection (10 µL) une première fois avec du MeOH puis une seconde avec du CH₂Cl₂ et enfin 3 fois avec la solution d'échantillon, avant l'injection de 2 µL de cette dernière dans la colonne.

La température du four est maintenue à 50°C pendant 3 min, puis augmentée avec un gradient de 3°C.min⁻¹ jusqu'à 130°C, puis jusqu'à 240°C avec un gradient de 10°C.min⁻¹. Les lignes d'injection et de transfert sont maintenues à une température de 250°C.

CHAPITRE 4 PRODUCTION ET ISOLEMENT DES PEPTAIBOLS

1- OBTENTION DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Notre objectif étant d'étudier, si possible, tous les peptaïbols des *Trichoderma* sp. présents sur l'estuaire de la Loire, nous avons utilisé comme stratégie :

- un large échantillonnage, 4 échantillons (eau de mer, coquillages, sédiments de surface et de profondeurs) sont prélevés à partir de 7 sites sélectionnés.
- une mise en culture *in vitro* des spores fongiques présentes dans les échantillons et isolement des *Trichoderma* sp., identifiées selon leurs aspects macro et microscopiques.
- une sélection d'un nombre de souche de *Trichoderma* sp. et vérification de leur production de peptaïbols à l'aide de la SM.
- enfin, une production des peptaïbols en quantités suffisantes pour en identifier la structure chimique.

Il faut remarquer que nous avons limité le nombre de souches traitées, en raison de l'importance des manipulations sur chaque souche. Le compromis nombre de souches existantes/nombre de souches traitées a été établi pour aboutir cependant à notre objectif.

1-1 Les sites de prélèvements

Les sites de prélèvements (Fig. 26) sont ceux choisis par Sallenave (1999) lors de son travail de thèse (étude de la flore fongique et recherche de souches toxigènes). Ce choix avait été dicté par les phénomènes de mortalité massive de coquillages enregistrés par les services de l'IFREMER en fin des années 1990.

Ces sites sont soit des parcs conchylicoles ou bien des lieux traditionnels pour le ramassage des coquillages sauvages.

Le site du Croisic est une zone vaseuse relativement fermée et découvre entièrement à marée basse. Ce lieu est propice à la pêche à pied pour ses gisements naturels de coquillages.

Le site de la Baule est situé sur la partie ouest de la plage à la limite du Pouliguen. Il abrite un gisement naturel de coques. Il faut savoir que cet endroit connaît une intense activité humaine qui s'accroît en période estivale et qui est source d'une importante pollution.

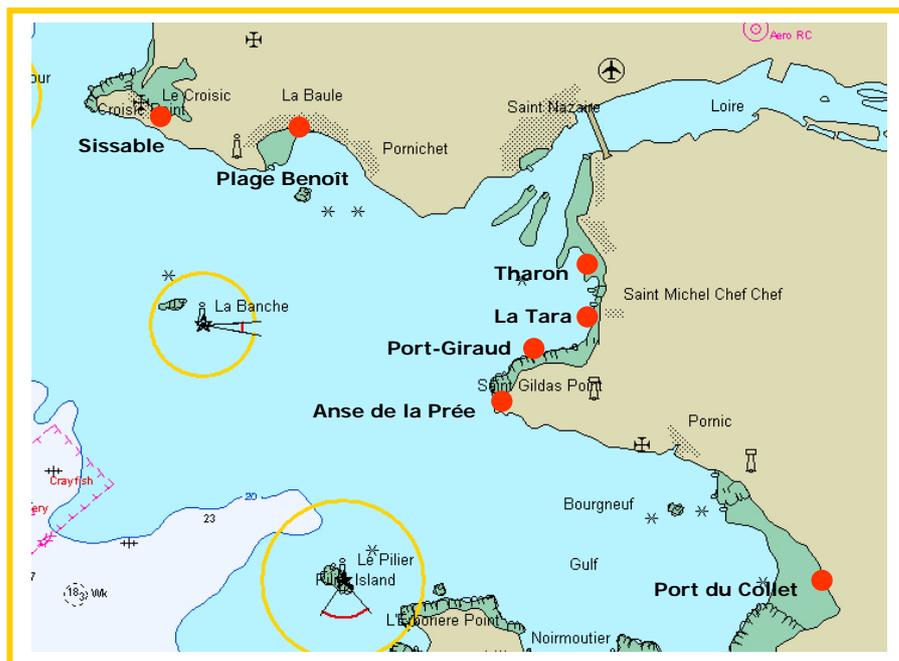


Fig. 26 : Lieux de prélèvements autour de l'estuaire de la Loire.

Le site du Tharon comporte une zone rocheuse au niveau du Rocher de la Roussellerie sur lequel se localise un gisement de moules.

Concernant les sites étudiés à la Plaine sur Mer (Port Giraud, La Tara et la Prée), ils comprennent des zones rocheuses sur lesquelles coexistent parcs de conchyliculture et gisements naturels de moules.

Le dernier site au port du Collet (sur la commune des Moutiers en Retz) est un parc ostréicole sur la rivière du Dain. Il abrite également quelques bateaux de pêche.

Les prélèvements ont été effectués en deux fois. Un premier échantillonnage a été effectué le 16 novembre 2001 et une seconde fois le 31 janvier 2002.

1-2 culture des souches à partir des prélèvements

Les spores fongiques contenus dans les différents échantillons (eau de mer, sédiments et coquillages) sont ensemencés sur de la gélose Sabouraud préparée avec de l'eau de mer naturelle (cf. paragraphe 1-3, chapitre 3).

Le milieu de Sabouraud est un milieu non spécifique. Il est riche en éléments nutritifs et convient à la croissance d'une importante variété de micromycètes. Sa préparation à l'eau de mer permet de se rapprocher des conditions de l'environnement marin.

La plupart des techniques d'études des champignons marins utilisent des milieux à base d'eau de mer naturelle, apportant ainsi la salinité et les éléments minéraux spécifiques de l'environnement marin (Fenical et Jensen, 1997 ; Pivkin, 2000), ainsi que certaines biomolécules, comme les acides aminés (Peters *et al.*, 1975).

Rohrman *et al.* (1992) recommande l'utilisation de l'eau de mer naturelle même dans la recherche de métabolites secondaires chez les micromycètes marins. Son travail a démontré que la production enzymatique, le rythme de croissance et la sporulation chez 11 espèces de champignons marins sur des milieux de culture à base d'eau de mer naturelle étaient identiques à ceux faits avec de l'eau de mer synthétique.

Après incubation, les colonies fongiques d'aspects et de tailles différents envahissent le milieu nutritif. L'étape suivante consiste à les isoler pour obtenir des cultures pures.

1-3 isolement et identification des souches du genre trichoderma productrices de peptaïbols

Les *Trichoderma* sp. se développent facilement *in vitro* (Grondona *et al.*, 1997 ; Kubicek *et al.*, 2003). Avec un rythme de croissance élevé, la taille des colonies de *Trichoderma* sp. est relativement plus importante que celle du reste des espèces fongiques présentes dans les échantillons.

A partir des cultures de prélèvements, des fragments mycéliens de colonies, différentes d'aspect et de couleur, sont individuellement ensemencés en boîte de Pétri (cultures intermédiaires). Après incubation, ces souches pures sont identifiées au niveau du genre. Du fait du nombre important des souches isolées et du coût élevé de la détermination de l'espèce à l'aide de la biologie moléculaire, nous avons d'abord procédé à une sélection des souches, et identifié l'espèce uniquement sur celles retenues.

Macroscopiquement, nous reconnaissons un *Trichoderma* sp. par sa façon cyclique de pousser sous forme de cercles concentriques réguliers.

Les colonies sont légèrement floconneuses ou en touffes, à surface lisse, translucide ou blanc aqueux. De nombreux types intermédiaires existent entre ces deux extrêmes, sachant que les 2 aspects peuvent exister sur la même colonie. La couleur des colonies varie du vert foncé au jaunâtre ou jaune.

Les souches de *Trichoderma* sp. présélectionnées selon les critères macroscopiques sont observées **sous microscope optique** pour confirmation. A l'aide de la méthode de Roth (cf. paragraphe 1-6, chapitre 3), nous recherchons un mycélium constitué d'hyphes ramifiés à parois lisses et hyalines (Bissett, 1984 ; Cournut, 1984), portant des conidiophores de forme conique ou pyramidale ainsi que des phialides en forme de quilles ou de flasques, spécifique du genre *Trichoderma* (cf. chapitre 1). Les phialides portent à leur extrémité des phialospores de forme ovoïde ou ellipsoïdale en général. Cette technique limite l'identification des *Trichoderma* sp. au niveau du genre uniquement.

Par ailleurs et pour conforter l'identification, nous nous sommes appuyé sur un outil supplémentaire de distinction. Il est connu que les *Trichoderma* sp. montrent des aspects variables selon le milieu de culture. Par contre, sous des conditions de culture identiques, la même espèce montre un aspect unique. Ainsi, la culture de chacune de nos souches marines sur différents milieux de culture solides, faciliterait la comparaison et donc la sélection.

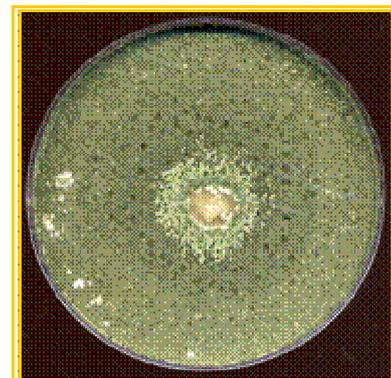
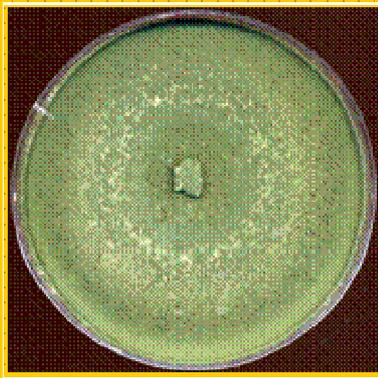
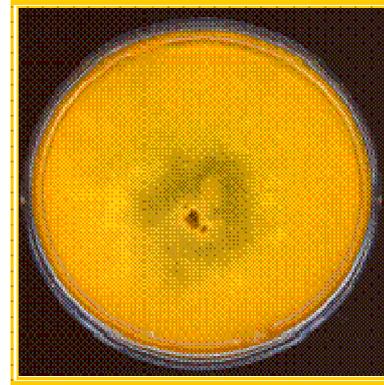
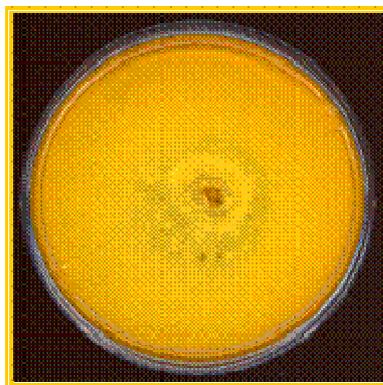
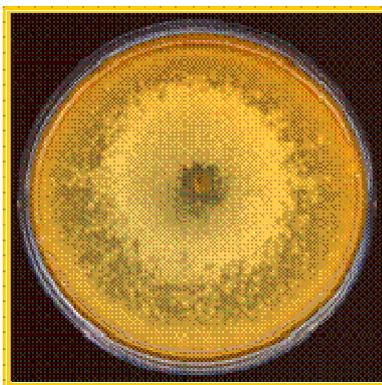
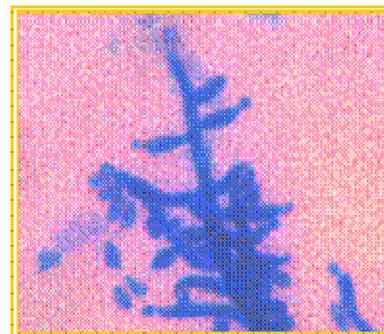
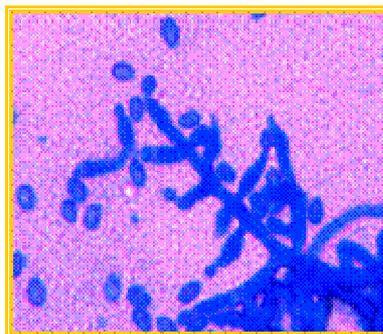
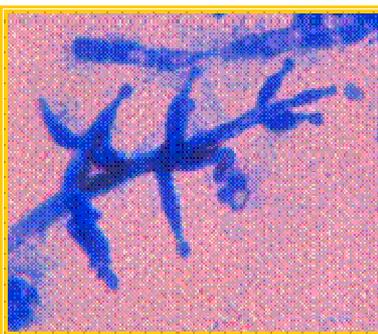
En fonction des milieux disponibles au laboratoire, nous avons cultivé nos souches dans des boîtes de Pétri de grande dimension, sur 4 milieux différents :

- Milieu malt à 1% à l'eau de mer
- Milieu malt à 1 % à l'eau distillée
- Milieu Sabouraud à l'eau de mer
- Milieu Sabouraud à l'eau distillée (cf. paragraphes 1-3 et 1-5, chapitre 3).

Après incubation à 27°C et envahissement mycélien total du milieu, nous avons pu, grâce à l'aspect macroscopique des souches et en fonction de chaque milieu, repérer celles qui se révèlent identiques.

L'ensemble de nos échantillons nous a fourni 20 souches présumées de *Trichoderma* sp., dont nous avons sélectionné 9 différentes par leurs aspects microscopiques, macroscopiques et culturels (Figs. 27, 28 et 29).

Restait à vérifier leur production de peptaïbols. Pour cela, les 9 souches ont été cultivées dans le milieu de fermentation liquide (cf. paragraphe 1-8-1, chapitre 3). Après extraction et semi-purification, nous avons pratiqué une analyse par SM pour rechercher le profil caractéristique des peptaïbols. Les résultats obtenus nous montrent que les 9 souches produisent bien des peptaïbols.

(a) Aspect macroscopiqueVue supérieureVue inférieure**(b) Aspect microscopique**

MMS 408

T. section longibrachiatum

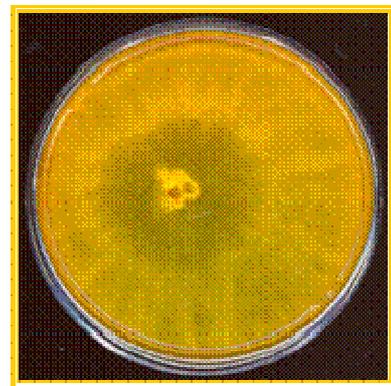
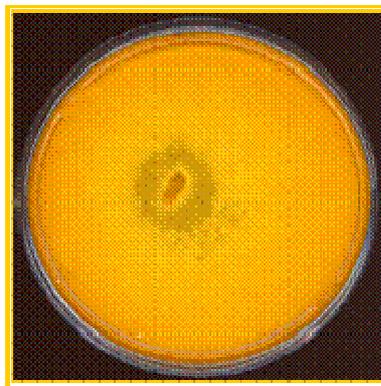
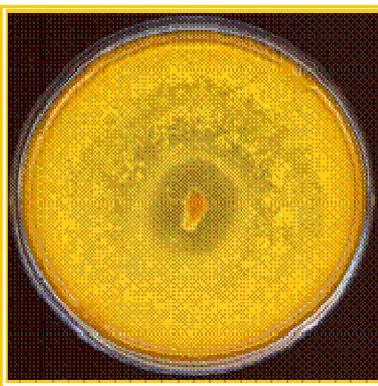
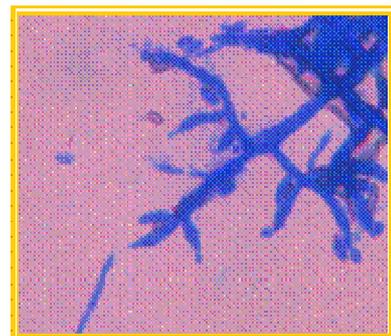
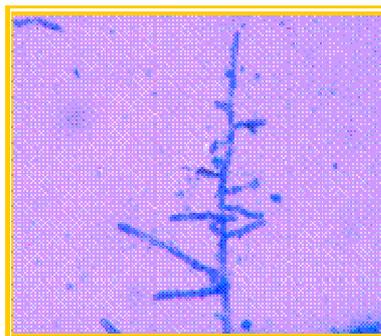
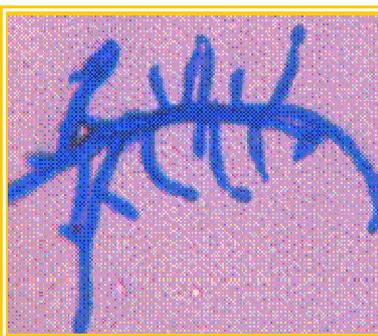
MMS 13

T. harzianum

MMS 58

T. section longibrachiatum

Fig. 27 : Aspect macro (a) et microscopique (b) (grossissement 40×10) des souches de *Trichoderma* MMS 408, 13 et 58, cultivées sur milieu malt à l'eau de mer.

Aspect macroscopiqueVue supérieureVue inférieure**(b) Aspect microscopique**

MMS 43

T. section longibrachiatum

MMS 204

T. section longibrachiatum

MMS 151

T. section longibrachiatum

Fig. 28 : Aspect macro (a) et microscopique (b) (grossissement 40×10) des souches de *Trichoderma* MMS 43, 204 et 151, cultivées sur milieu malt à l'eau de mer.

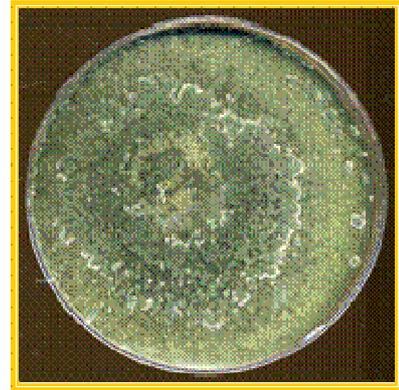
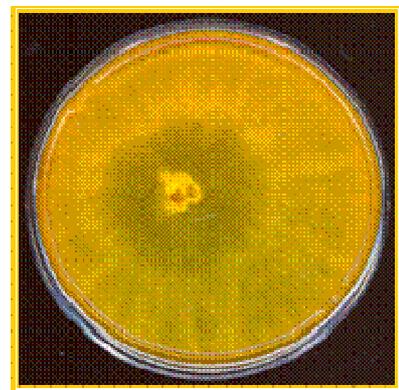
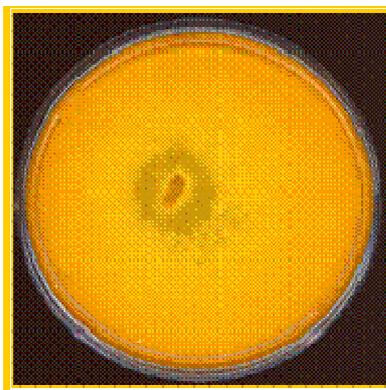
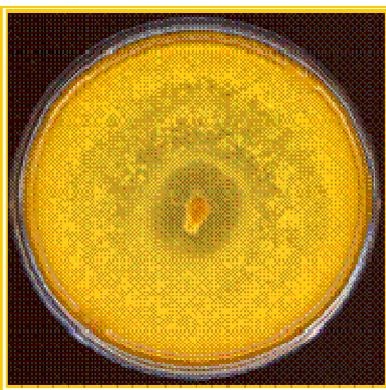
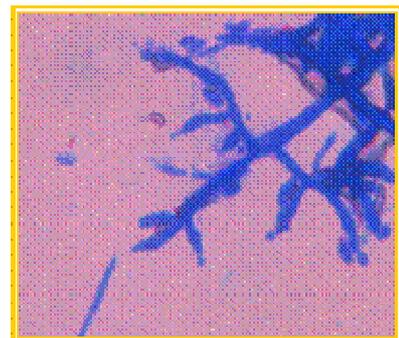
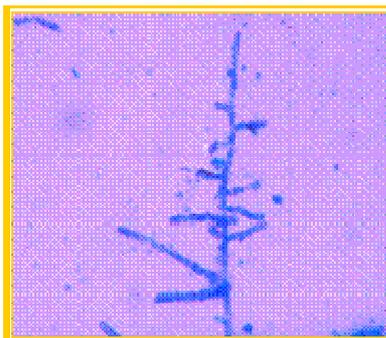
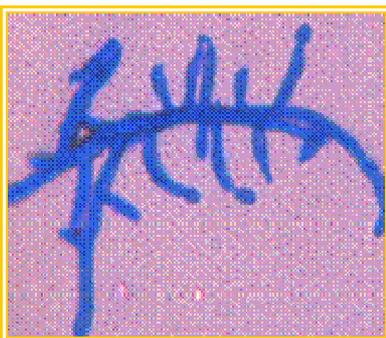
Aspect macroscopiqueVue supérieureVue inférieure**(b) Aspect microscopique****MMS 43*****T. section longibrachiatum*****MMS 204*****T. section longibrachiatum*****MMS 151*****T. section longibrachiatum***

Fig. 28 : Aspect macro (a) et microscopique (b) (grossissement 40x10) des souches de *Trichoderma* MMS 43, 204 et 151, cultivées sur milieu malt à l'eau de mer.

1-4 Conservation dans la Mycothèque et utilisation des souches

Pour procéder à leur conservation de longue durée (plusieurs années), les souches sélectionnées sont repiquées en triple dans des séries de tubes de Sabouraud en culot (cf. paragraphe 1-5, chapitre 3). Après incubation (27°C pendant 7 jours), les colonies sont recouvertes d'huile de paraffine stérile (à hauteur d'un centimètre environ). Chaque souche est répertoriée et introduite dans la mycothèque sous un numéro de code MMS (mycothèque marine du SMAB).

Par ailleurs, chacune des 9 souches sélectionnées estensemencée dans une série de tubes coulés en pente (cf. paragraphe 1-5, chapitre 3). Après incubation (27°C pendant 7 jours), les tubes sont conservés au congélateur.

Cette batterie de tubes servira pour l'ensemble des travaux, chaque tube étant à usage unique de repiquage. En effet, des repiquages répétés peuvent provoquer une évolution des souches, ce qui se traduit par une variabilité importante de leurs critères d'origine, appelée « instabilité de la souche ». Les effets les plus fréquemment observés dans ces cas portent sur la couleur des colonies, sur la capacité de développement ou de reproduction sur les substrats ainsi que sur la production de métabolites secondaires (Grovel, 2002).

1-5 identification au niveau de l'Espece

Les 9 souches sélectionnées vont servir de matériel biologique pour l'obtention des peptaïbols. Il devient donc important d'en déterminer l'espèce avec certitude.

Connaissant la complexité de l'identification des espèces de *Trichoderma* (cf. paragraphe 6-2, chapitre 1), nous avons sollicité la collaboration de Monsieur J. Bissett (Centre de recherches de l'Est sur les céréales et oléagineux, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Ferme expérimentale centrale, éd. KW Neatby. 960, avenue Carling OTTAWA, Ontario, K1A 0C6) spécialisé dans la taxonomie de ce genre, afin de déterminer le plus précisément possible les espèces de *Trichoderma* dont nous envisageons l'étude.

Le principe de cette méthode est relaté dans le paragraphe 1-7, chapitre 3.

Sur le tableau 4 figurent les résultats de la détermination taxonomique ainsi réalisée.

Tableau 4 : Code MMS, espèces et sections, lieu et origine des prélèvements des souches étudiées

Code SMAB	Genre et espèce	Lieu de prélèvement	Origine
MMS 408	<i>Trichoderma</i> section <i>longibrachiatum</i>	Le Croisic	Coque
MMS 13	<i>T. harzianum</i> Rifai	Le Croisic	Coque
MMS 58	<i>T.</i> section <i>longibrachiatum</i>	La Tara	Moule
MMS 147	<i>T.</i> section <i>longibrachiatum</i>	Tharon	Moule
MMS 151	<i>T.</i> section <i>longibrachiatum</i>	Tharon	Moule
MMS 175	<i>T.</i> section <i>longibrachiatum</i>	Port Giraud	Sédiments de surface
MMS 204	<i>T.</i> section <i>longibrachiatum</i>	La Baule	Sédiments de surface
MMS 43	<i>T.</i> section <i>longibrachiatum</i>	Le Croisic	Sédiments de profondeur
MMS 752	<i>T. harzianum</i> Rifai	Port du Collet	Sédiments de surface

Deux souches sur les 9 appartiennent à l'espèce *harzianum* alors que les 7 restantes sont de la section *longibrachiatum*.

2- PRODUCTION DE PEPTAÏBOLS

Au départ nous avons utilisé le protocole mis au point par Landreau (2001) lors de son travail de thèse, visant l'isolement et l'identification des toxines responsables de l'activité neurotoxique de souches de *Trichoderma* sp. Ce protocole avait permis de découvrir que les peptaïbols étaient responsables de cette activité.

Ce protocole consistait à :

- préparer une suspension de spores à partir de cultures (sur gélose Sabouraud à l'eau de mer) âgées de 4 semaines (cf. chapitre 3, paragraphe 1-8-1).
- ensemercer sur milieu liquide KM (milieu pauvre stimulant de ce fait la biosynthèse de métabolites secondaires chez les champignons) (Miller, 2000) (cf. paragraphes 1-8-1, chapitre 3).
- filtrer sur membrane de cellulose (0,45 µm, Millipore Bedford MA).

- extraire le jus de filtration à l'aide d'un protocole séparant les substances selon un gradient de polarité croissante (Fig. 30). Le volume de 300 mL de culture est extrait par 3 fois 200 mL de chacun des 3 solvants suivants : hexane, CH_2Cl_2 et AcOEt.
- déshydrater, évaporer, récupérer et purifier l'extrait CH_2Cl_2 sur colonne Diol selon un gradient par palier d'EtOH dans du CH_2Cl_2 , générant 8 fractions, dont la fraction 10% contenant les peptaïbols
- analyse par CLHP de la fraction 10%

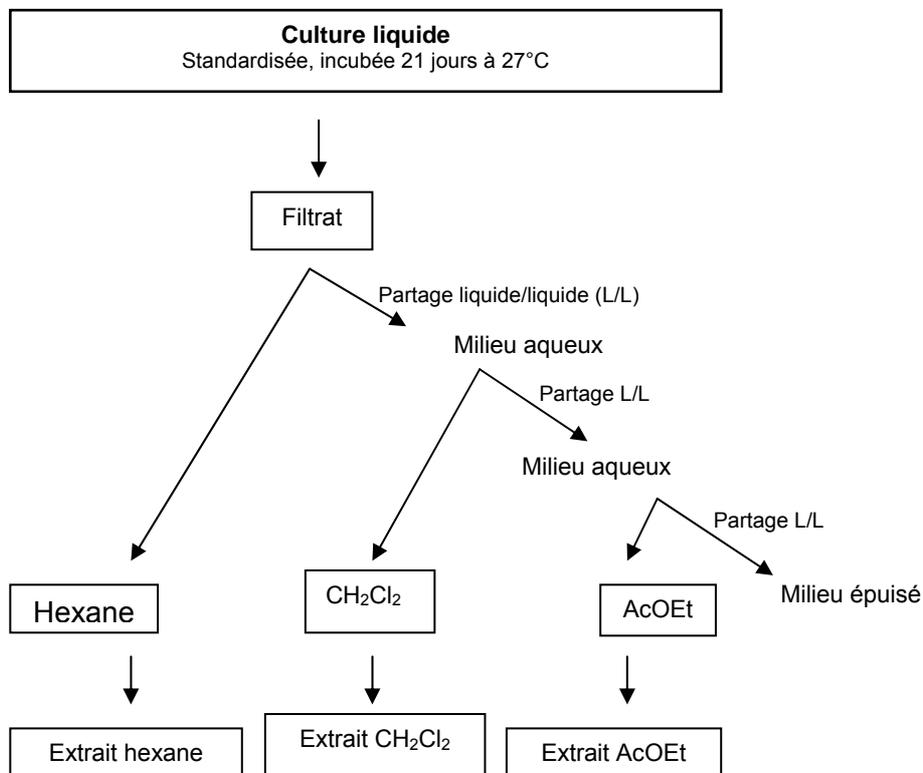


Fig. 30 : Extraction des peptaïbols du milieu liquide - Mode opératoire (Landreau, 2001).

Dès les premiers essais, nous avons rencontré des problèmes à tous les niveaux de ce procédé, ce qui nous a amené à le revoir. Cette étape d'optimisation était d'autant plus nécessaire qu'il nous fallait une méthode fiable pour la production de grandes quantités de peptaïbols.

2.1 optimisation du protocole de production de peptaïbols

Cette optimisation vise :

- la production de spores et la technique d'extraction
- la fermentation elle-même, avec le passage d'un milieu liquide à un milieu solide, ce qui entraîne une nouvelle modification du procédé d'extraction et de séparation chromatographique des peptaïbols.

2-1-1 Production de la suspension de spores

Problèmes rencontrés : La croissance fongique est lente et de durée fluctuante sur Sabouraud. Le Tween 80, utilisé pour détacher les spores, se retrouve dans les extraits organiques et empêche leur évaporation.

Solution testée et résultats : L'utilisation de milieu Malt à l'eau de mer, milieu pauvre favorisant la sporulation fongique, permet d'obtenir en 7 jours à 27°C une abondante sporulation. La récupération des spores était possible par un simple lavage des cultures à l'eau distillée.

2-1-2 L'extraction des peptaïbols

Problèmes rencontrés : L'utilisation de 3 solvants différents avec un important rapport volume solvant/ volume milieu à extraire impose la manipulation de grands volumes de solvants. De plus, l'extraction à l'hexane présente peu d'intérêt (absence d'impuretés extraites), de même que celle à l'AcOEt (absence de peptaïbols).

Solution testée et résultats

- Réduction de moitié du ratio volume du CH_2Cl_2 / volume du milieu fermentaire liquide (4,5 L de solvant/litre de milieu au lieu de 9 L) sans modification des masses d'extrait
- Suppression de l'extraction à l'hexane et à l'AcOEt.

2-1-3 Changement du milieu de fermentation

Problèmes rencontrés

- La préparation des suspensions sporales passe par un comptage de spores laborieux sur cellule Malassez et pas entièrement adapté donc aléatoire, d'autant plus que les ensemencements liquides sont nombreux (vu le volume du milieu limité à 300 mL/flacon)
- Faible production de masse
- Durée importante de la fermentation liquide (50 jours, soit 4 semaines pour la production des spores et 3 autres pour la fermentation)

Solution testée et résultats

L'optimisation des procédés microbiologiques passe principalement par la sélection de milieux simples et économiques ainsi qu'une technique de culture optimale (Pavlovicova, 1998). Aussi avons-nous testé le milieu KM en le solidifiant par l'ajout de l'agar-agar (KMS) (cf. chapitre 3, paragraphe 1-8-2).

Ce qui a entraîné :

- La modification de la technique de l'ensemencement

Les souches sont directement ensemencées sur milieu KMS coulé en fioles de Roux par la technique des implants (cf. paragraphe 1-8-2, chapitre 3). Chaque fiole est ensemencée par le dépôt d'un ou de deux implants à la surface du milieu.

L'ensemencement est ainsi simplifié et ses paramètres mieux contrôlés étant donné que la surface mycélienne déposée est constante.

Il a fallu alors adapter le procédé d'extraction.

▪ Adaptation de la technique d'extraction des peptaïbols (Fig. 31)

Le milieu de culture est liquéfié au bain-marie à 80°C, puis ramené à une température d'environ 40°C (le milieu reste encore liquide), pour éviter une ébullition du solvant lors de l'ajout des 300 mL de CH₂Cl₂ par litre de culture. Après agitation, le solvant est récupéré, puis cette étape est répétée encore 2 fois et les solvants récupérés sont mélangés.

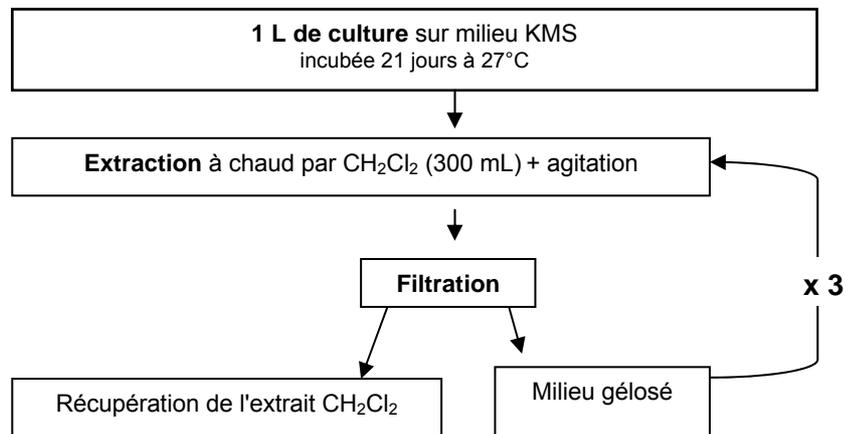


Fig. 31 : Production des peptaïbols sur milieu gélosé - Mode opératoire.

La SM nous montre la présence des toxines dès la première semaine d'incubation, avant même que le micromycète n'ait fini d'envahir le milieu de culture. Les peptaïbols feraient alors partie des mycotoxines d'exception, qui sont produits avant la phase stationnaire de croissance des *Trichoderma* sp. (au cours de laquelle sont formés la plupart des métabolites secondaires) (Blumenthal, 2004).

Nous avons alors tenté de réduire la période d'incubation (21 jours) en étudiant la cinétique de biosynthèse des peptaïbols sur milieu KMS au bout d'une, 2 et 3 semaines chez la souche MMS 147, choisie pour sa croissance rapide et son bon rendement.

Mais si les peptaïbols apparaissent rapidement, la masse de l'extrait est 4 fois plus importante en 3 semaines qu'en une semaine d'incubation, ce qui nous a poussé à conserver une période de fermentation de 21 jours.

2-1-4 Modification de la VLC

Problèmes rencontrés

Nombre important de fractions, protocole long et volume important de solvant.

Solutions testées et résultats

L'analyse par SM du fractionnement usuel permet de localiser les peptaïbols et d'optimiser le fractionnement. Après optimisation du volume, de la polarité et du nombre des fractions, de nouvelles conditions opératoires de pré-purification par VLC ont été définies (cf. paragraphe 2-2, chapitre 3) tout en préservant le rendement initial.

Les peptaïbols (issus de la fermentation liquide ou solide) absents dans la fraction **A**, sont présents surtout dans la fraction **B** et beaucoup moins dans la fraction **C** (tableau 5).

Tableau 5 : Répartition des masses moyennes et présence des peptaïbols dans les fractions VLC pour un échantillon de 100 mg

Désignation de la fraction	A	B	C
% EtOH dans CH ₂ Cl ₂	2	10	15
Répartition moyenne des masses en %	82,6	3,3	2,4
Présence de peptaïbols	-	+++	-
Pertes en %	12		

La production optimisée des peptaïbols consiste donc à ensemercer des fioles de Roux coulées de KMS par des implants fongiques de *Trichoderma* sp. âgés de 7 jours. Après incubation pendant 3 semaines à 27°C, les peptaïbols sont extraits directement du KMS à l'aide de CH₂Cl₂. L'extrait peptaïbols est pré-fractionné par VLC et les peptaïbols sont concentrés dans la fraction 10%.

2-3 validation de l'optimisation

Afin de vérifier la validité du nouveau procédé, nous avons voulu comparer son efficacité par rapport à l'ancien protocole (en milieu liquide).

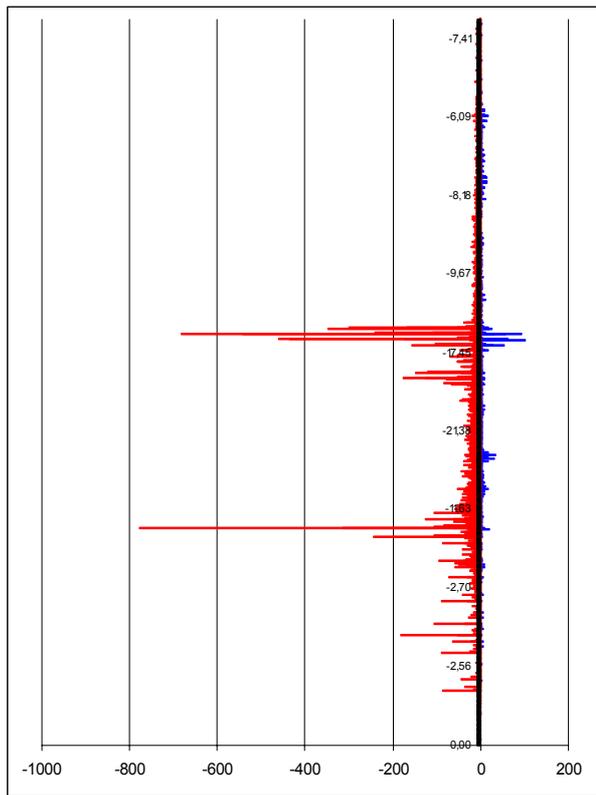
Mais la difficulté réside dans le nombre important des souches de *Trichoderma* sp. étudiées (9), et de la gamme importante de peptaïbols qu'ils produisent.

Nous avons alors choisi d'utiliser la SM pour comparer les fractions VLC 10% des 9 souches de *Trichoderma* sp. obtenues des cultures liquides et solides.

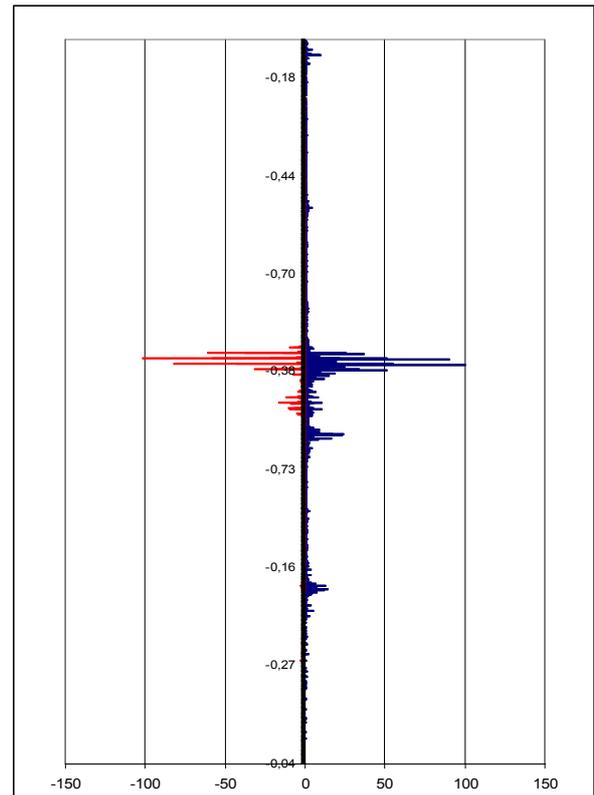
L'analyse des données spectrales a été réalisée à l'aide de l'outil informatique (Microsoft Excel™). Pour faciliter cette comparaison, devant la complexité des spectres (nombre de pics), nous avons procédé à un regroupement de certains pics. L'ensemble des ions m/z et de leur abondance relative correspondante est récupéré en listing numérique à partir du logiciel d'origine puis recopier sur Excel. Nous avons ensuite additionné les abondances des pics par exemple 300,1 à 300,9 à l'abondance du pic 300 ne conservant donc que ce seul pic (300) par unité de masse. Nous avons également éliminé les pics d'abondance relative <10% en les considérant comme faisant partie du bruit de fond. Cette comparaison n'a pu être réalisée que sur 8 souches, la production en peptaïbols de la souche MMS 408 dans le milieu liquide étant trop faible.

Les résultats obtenus pour les 8 souches marines montrent une grande similitude entre les spectres SM de la culture liquide et ceux de la culture solide (sur KMS), avec une importante ressemblance des pics majoritaires. Ils contiennent donc les mêmes peptaïbols, mais de nombreuses impuretés se trouvent dans les extraits de culture liquide (Figs. 32 et 33).

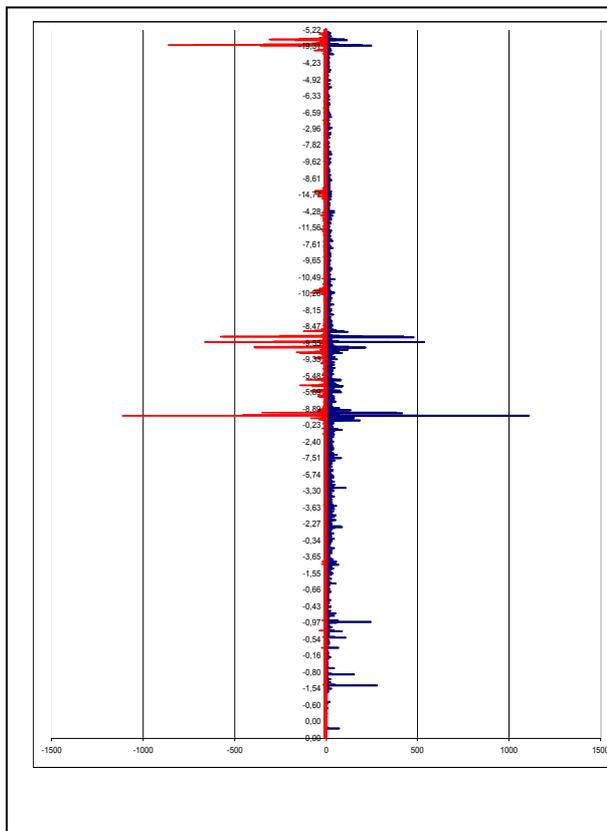
La fermentation sur milieu KMS est donc plus avantageuse que la culture liquide.



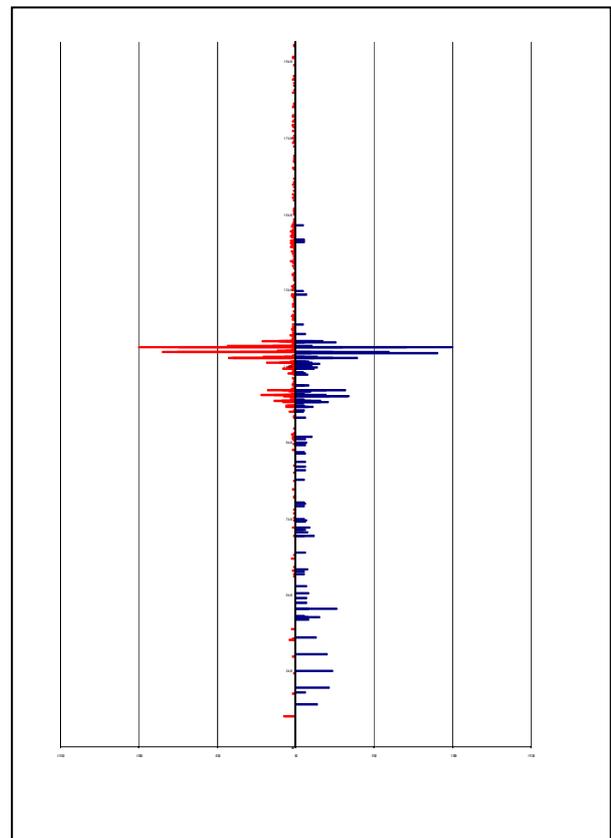
Souche MMS 13



Souche MMS 10

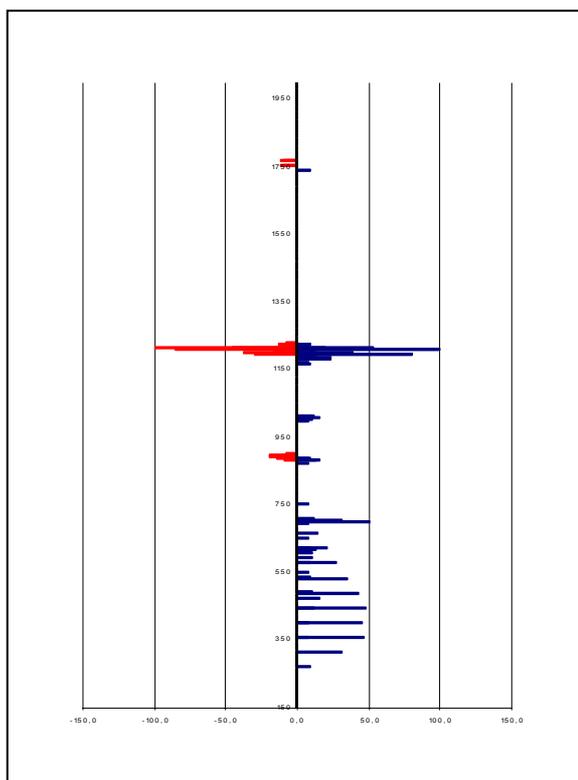


Souche MMS 147

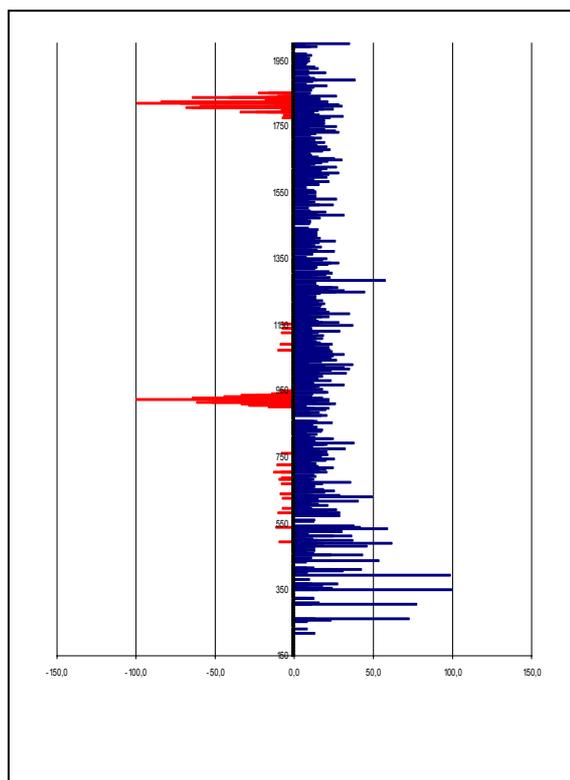


Souche MMS 151

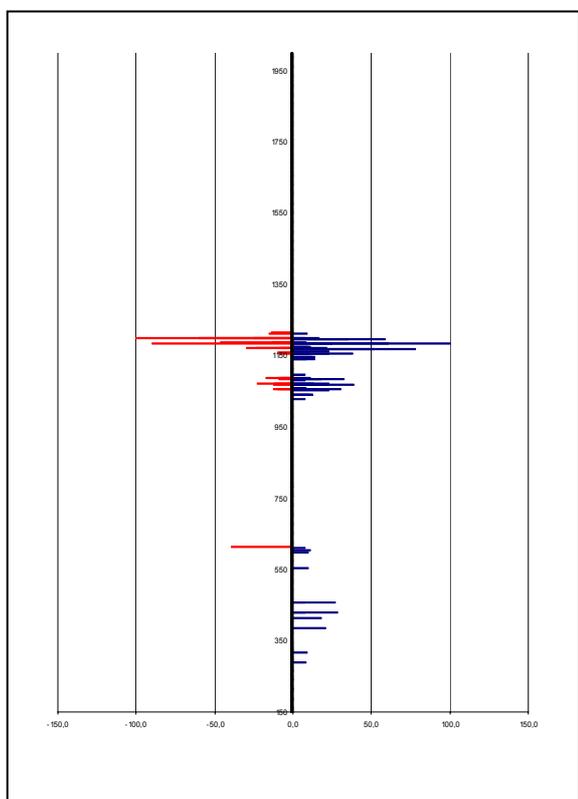
Fig. 32 : Comparaison des spectres SM des extraits CH_2Cl_2 issus de culture solide ■ avec ceux de culture liquide ■



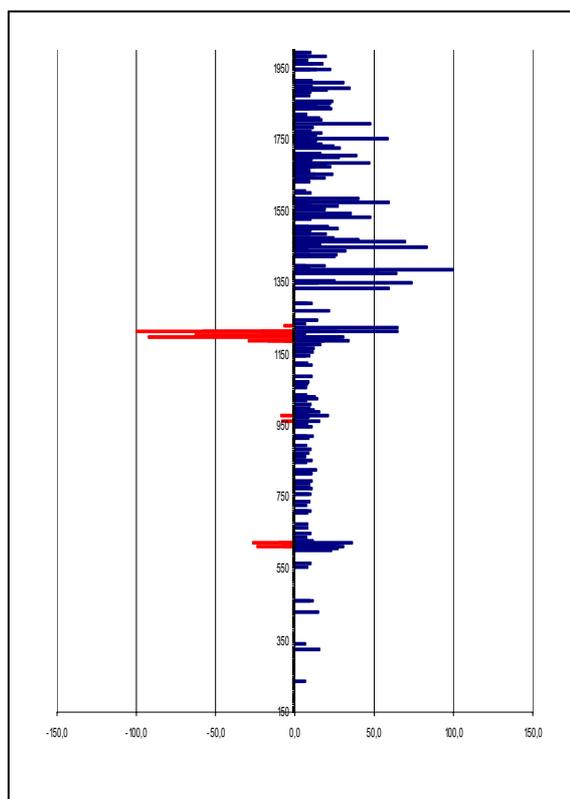
Souche MMS 175



Souche MMS 204



Souche MMS 43



Souche MMS 752

Fig. 33 : Comparaison des spectres SM des extraits CH_2Cl_2 issus de culture solide ■ avec ceux de culture liquide ■

2-4 bilan de l'optimisation

Pour une production en peptaïbols qualitativement semblable, la fermentation sur KMS présente les précieux avantages suivants :

- Quantité importante d'extrait brut obtenue : une culture d'environ 200 cm² (en fioles de Roux) fournit quasiment la même quantité d'extrait qu'un litre de culture liquide (3 flacons de 300 mL).
- Réduction du temps d'incubation : de plus de 45 jours à 21 jours seulement, en supprimant la période de production des spores en fioles de Roux (4 semaines).
- Economie de la manipulation sur KMS : pour un litre de milieu liquide, une filtration sur Célite, puis sur plusieurs membranes Millipore (porosité 1,20 et 0,45µm de diamètre) sont nécessaires. L'utilisation de ce consommable (surtout les membranes Millipore) revient assez cher. L'extraction se fait avec 3 L de solvant.
Sur KMS, on utilise moins de matériel et de produits. Pour la même quantité d'extrait, les étapes de filtration sont supprimées, seul 1 L de solvant est utilisé (plus de 66% de solvant économisé).
- Gain de temps durant l'extraction

2-5 Protocole définitif de production de peptaïbols

A partir des souches *Trichoderma* sp. identifiées et stockées au congélateur, des repiquages sont réalisés sur gélose de Sabouraud à l'eau de mer. Après incubation (1 semaine à 27°C), des implants mycéliens sont préparés dans la gélose nutritive à l'aide d'un emporte pièce. Ils servent à ensemer des séries de fioles de Roux coulées en milieu KMS. Après incubation (3 semaines à 27°C), les cultures sont fondues dans un bain-marie. L'ensemble gélose-mycélium est extrait au CH₂CL₂ (cf. paragraphe 2-2-3 de ce chapitre).

2-6 selection de 4 souches représentatives des 9 *trichoderma sp. initiaux*

Durant cette étude comparative, nous nous sommes rendu compte que certaines souches avaient des profils SM en peptaïbols d'aspect particulièrement proche, malgré des différences macro et microscopiques. De ce fait, il devient inutile de travailler sur l'ensemble des 9 souches, puisque seules sont intéressantes celles productrices de peptaïbols différents, compte tenu que l'isolement de la plus grande variété de peptaïbols constitue l'objectif essentiel de ce travail.

Les résultats obtenus montrent que les 9 souches présélectionnées de *Trichoderma sp.* peuvent être réparties en 4 groupes (Fig. 34), en fonction de leur production en peptaïbols :

- Groupe 1 : MMS 151
- Groupe 2 : MMS 13, MMS 58, MMS 147, MMS 43, MMS 752
- Groupe 3 : MMS 408, MMS 175
- Groupe 4 : MMS 204

Une espèce représentative de chaque groupe a été choisie pour le reste du travail ; ce sont respectivement les MMS 151, MMS 147, MMS 175 et MMS 204.

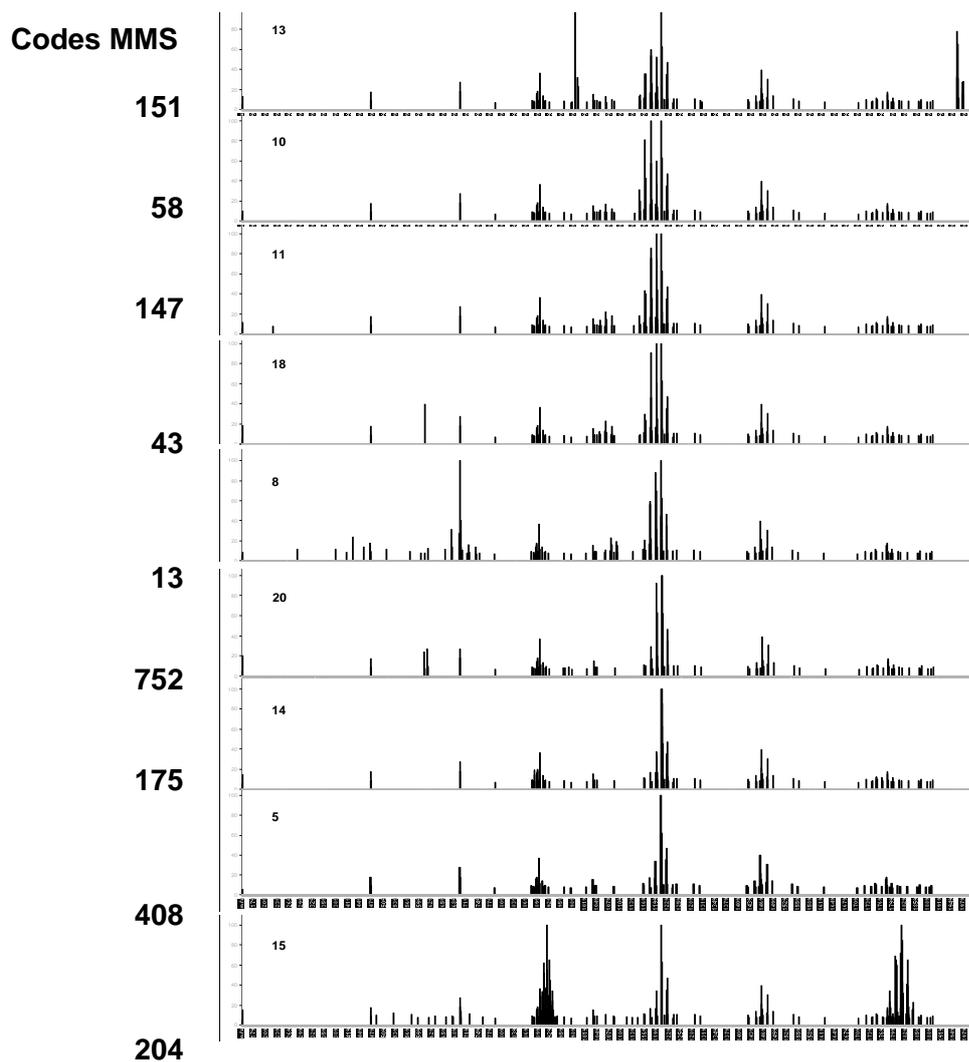


Fig. 34 : Regroupement des 9 souches de *Trichoderma* sp. marins en 4 groupes selon le profil métabolique peptaïbols.

3- PRODUCTION MASSIVE DES PEPTAÏBOLS

Les conditions optimisées de production des peptaïbols ont été appliquées pour une production massive de ces métabolites. Chaque « souche groupe » estensemencée dans des fioles de Roux (150 mL/unité), pour un volume total de 5 L de milieu KMS. Les cultures sont incubées à 27°C pendant 21 jours. L'extraction est suivie d'une pré-séparation par VLC, et les peptaïbols concentrés dans la fraction 10% sont séparés par CLHP.

Comme le montre le tableau 6, la masse des extraits obtenus de la culture des 4 « souches groupes » est variable.

Tableau 6 : Masses des extraits CH₂Cl₂ et des fractions VLC 10 % produites par les 4 « souches groupes »

Souches	Masse de l'extrait CH ₂ Cl ₂ en mg	Masse de la Fraction VLC 10% en mg
MMS 147	268,5	10
MMS 151	605,7	32,5
MMS 175	365,0	27
MMS 204	191,2	6

4- PURIFICATION DES PEPTAÏBOLS PAR CLHP ANALYTIQUE

L'analyse des mycotoxines par CLHP conduit souvent à l'utilisation de colonne C18 en phase inverse avec ou sans gradient et une détection par UV (Betina, 1989), comme c'est aussi le cas des peptaïbols.

Cependant, la séparation complète de ces derniers est quasi impossible en raison du phénomène de microhétérogénéité (Przybylski *et al.*, 1984 ; Matsuura *et al.*, 1993 ; Brückner *et al.*, 2002a). Des étapes ultérieures en CLHP s'avèrent parfois nécessaires (El Hajji *et al.*, 1987). En effet, la présence du groupement acétyle en début de chaîne des peptaïbols réduit leur interaction avec la phase stationnaire. Toujours est-il qu'en

comparaison avec les peptides communs, les peptaïbols ont un t_R plus court (Brückner *et al.*, 1987b).

En conséquence, notre objectif était de séparer les peptaïbols selon les pics détectés, en sachant que selon toute probabilité, certains pics, voire tous, seraient en fait constituées de pics microhétérogènes.

Au départ, nous avons reproduit le protocole CLHP en mode analytique adopté par Landreau (2001) :

Colonne : phase C18 Inertsil ODS 3 ; 5 μm , 4.6 x 250 mm (Interchim, France)

Solvant : MeOH/eau 85 :15 v:v

Débit : 1 mL/min

Pression : 2000 PSI

Détecteur UV : 220 nm

Masse de l'échantillon : ≤ 0.3 mg

Volume de l'injection : 10 μL

4-1 Problèmes rencontrés en CLHP

Au début, nous avons repris la souche de *Trichoderma koningii* Oudemans, MMS 19, étudiée par Landreau (2001), et nous sommes alors parvenu à reproduire l'ancien protocole CLHP. Par contre, appliqués aux autres extraits des « souches groupes », des essais répétés n'ont donné que des résultats médiocres : profils chromatographiques inconstants, durée d'analyse beaucoup plus longue, etc. En outre, quelques analyses SM des fractions recueillies dans la zone d'élution des peptaïbols montrent la présence de mélanges complexes.

Il nous a donc fallu, là encore, optimiser cette étape, et ce d'autant plus que notre projet impliquait des séparations en mode semi quantitatif, ce que ne permettait pas le procédé de Landreau (2001).

4-2 Solutions proposées et résultats

Nous avons reconsidéré chacun des paramètres pouvant influencer la séparation :

Qualité de la colonne : Vérifiée à l'aide du bistramide A (produit de référence du laboratoire) (cf. paragraphe 2-3, chapitre 3), la colonne se comportait correctement.

Interaction colonne-peptaïbols : Analyse par SM et CCM (révélation à l'orthotolidine) avant et après passage des extraits peptaïbols dans la colonne.

Les résultats montrent que les produits ne sont ni détruits, ni fixés irréversiblement, ni insolubles dans l'éluant.

Le paramètre solvant : Vérifié en raison des t_R élevés. L'élution des extraits peptaïbols est testée avec différentes proportions d'un mélange MeOH/eau (77:23, 80:20, 85:15, 90:10 v:v), sans amélioration de la qualité de la séparation.

Effet du pH du solvant d'élution :

La phase stationnaire utilisée est une silice greffée octadecyle. Mais le taux de ce greffage laisse entre 25 et 50% des groupements silanols libres, capables d'interagir avec les molécules cationiques présentes dans le milieu. Parmi les solutions utilisées pour résoudre ce problème des silanols résiduels et pour s'affranchir de leur ionisation, l'acidification du milieu par l'ajout d'acide. L'acide ajouté forme, par ailleurs, des paires d'ions avec les molécules à séparer neutralisant ainsi des charges portées par ces dernières (Le Mapihan, 2004).

Pour acidifier la phase mobile, nous avons utilisé de l'acide acétique, testé à 3 concentrations différentes : 0,1 ; 0,05 et 0,01%. La concentration de 0,05% est optimale. La résolution des pics devient satisfaisante. En plus, cette concentration faible en acide n'influence pas la qualité d'analyse par SM des fractions récupérées, notamment le séquençage.

4-3 Protocole final adopté pour la CLHP

Les profils CLHP obtenus montrent que les extraits semi-purifiés obtenus à partir du milieu KMS sont tous de composition différente.

Ce protocole CLHP adapté à la nature de nos produits, est appliqué alors aux extraits des 4 « souches groupes ». Une collecte de fractions est opérée selon les pics du chromatogramme (un pic = une fraction) pour les analyser par SM.

Grâce à cette technique de séparation, nous avons obtenu des fractions de peptaïbols d'une bonne pureté. Une masse de 0,3 à 0,5 mg d'extrait VLC chromatographié par CLHP, suffit pour le séquençage des peptides en ESI-MSⁿ.

5- PURIFICATION DES PEPTAÏBOLS PAR CLHP EN MODE PRÉPARATIF

Les quantités de peptaïbols obtenus par CLHP analytique restaient insuffisantes pour envisager des tests biologiques des principes actifs de toutes les souches étudiées en même temps.

Afin de préparer cette étape bien prévue au laboratoire, nous avons mis au point une séparation préparative (cf. paragraphe 2-3, chapitre 3).

Au départ, nous sommes parvenu à injecter une quantité de 1 mg d'extrait VLC avec une bonne qualité de séparation. Mais au-delà de cette quantité, la qualité de la séparation se dégradait.

Pour y remédier, nous avons testé une séparation CLHP en deux temps :

- Séparation d'abord de l'« ensemble peptaïbols » du reste des produits présents dans la fraction, en fonction des t_R probables des peptaïbols, nous avons collecté tous les produits précédant l'élution des ce derniers.
- A partir d'un t_R de 5 min, commence la collecte de l'ensemble peptaïbols, cette fraction sera réinjectée dans la colonne dans les mêmes conditions analytiques, cette fois-ci pour la séparation des peptaïbols.

Par ce moyen, la séparation s'est nettement améliorée. Nous sommes parvenu à une masse optimale de 7 mg d'extrait par injection, tout en gardant une bonne qualité de séparation.

CONCLUSION

Vu le nombre important de souches de *Trichoderma* sp. à étudier, nous avons tenté d'améliorer les conditions de culture et la technique d'extraction mises au point par Landreau (2001) afin d'améliorer le rendement et de disposer ainsi de quantités suffisantes de peptaïbols pour notre étude.

Nous sommes parvenu à simplifier la méthode de fermentation liquide. Puis nous avons développé une fermentation sur milieu solide (KMS) beaucoup plus avantageuse. L'obtention des peptaïbols est donc améliorée.

Après analyse des données obtenues de la SM, il s'avère que certaines souches ont les mêmes profils métaboliques de peptaïbols, permettant ainsi de les regrouper. Quatre groupes sont ainsi créés. Une souche représentative de chaque groupe a été élue pour la suite du travail et c'est ce que l'on appellera les « souches représentatives » ou encore « souches groupes ».

Dans le but de connaître la structure des peptaïbols que produisent les 4 souches représentatives, nous avons procédé à une analyse par CLHP pour la séparation des constituants des extraits VLC (fraction B).

Le protocole disponible dans le laboratoire, mis au point pour l'analyse des peptaïbols d'une seule souche de *Trichoderma* sp. n'était pas facilement applicable pour les souches que nous avons étudiées. Il nous a fallu revoir l'ensemble des paramètres pour enfin trouver que le changement du pH de l'éluant offrait la solution pour une meilleure séparation.

Par la suite, et dans la mesure où les quantités de peptaïbols séparés par CLHP en mode analytique étaient insuffisantes pour réaliser des tests biologiques, nous avons mis au point un protocole de séparation chromatographique en mode préparatif.

CHAPITRE 5-IDENTIFICATION STRUCTURALE DES PEPTAIBOLS

Introduction

Le séquençage des peptides se fait habituellement par :

- des méthodes d'hydrolyse enzymatique
- la méthode d'Edman : réaction en milieu basique puis clivage en milieu acide.

Cependant l'élucidation de la structure chimique des peptaïbols par ces méthodes conventionnelles est peu praticable en raison de leurs extrémités «bloquées» et de leur richesse en AA spécifiques, particulièrement les résidus acide α aminoisobutyrique (U). En conséquence, les techniques spectroscopiques (SM et RMN) représentent une bonne alternative d'analyse de ces peptides particuliers (Przybylski *et al.*, 1984 ; Brückner et Przybylski, 1984 ; Brückner *et al.*, 1985 ; Johnson et Biemann, 1987 ; Biemann, 1988, 1992 ; Hlimi, 1997 ; Auvin, 1999).

En raison de la disponibilité de la LC-MS dans notre laboratoire, nous avons opté pour la méthode de séquençage des peptaïbols mise au point par Przybylski *et al.* (1984) et qui préconise une purification préalable par CLHP suivie de l'analyse par SM (David *et al.*, 1981 ; Brückner et Przybylski, 1984 ; Pocsfalvi *et al.*, 1997).

Toutefois, la SM ne nous permet pas de différencier les AA isomériques dans les séquences. Le recours à la CPG et au procédé de « dérivatisation » pour l'analyse des hydrolysats acides de ces AA isomériques nous permet de compléter les séquences des peptaïbols.

1- IDENTIFICATION ET SEQUENÇAGE DES PEPTAÏBOLS PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Roepstorff et Folman (1984) ont expliqué le comportement des peptides protonés en SM et établi un raisonnement pour élucider les séquences peptidiques à partir des spectres SM obtenus. Nous avons adopté cette méthode, toujours d'actualité mais modifiée par Biemann (1988), afin d'établir la séquence des peptaïbols.

1-1 Principe de séquençage des peptaïbols en SM

Au départ, l'application d'une énergie de collision provoque la rupture des liaisons peptidiques des peptaïbols. Ce processus, appelé CID (*collision induced dissociation*, cf. paragraphe 3-1-3, chapitre 3), réactive les ions moléculaires par collision avec les molécules d'un gaz (Morris et Panico, 1981 ; Kanai *et al.*, 1996).

Il y a alors naissance de 4 types d'ions fragments : majoritairement des N-terminaux et des C-terminaux, ainsi que des ions fragments internes et des pertes de chaîne latérale beaucoup moins abondants (Vinh, 1999).

Les **fragments N-terminaux**, notés a, b et c (Fig. 35), sont obtenus :

- soit par rupture au niveau d'une liaison peptidique. Dans ce cas, la charge de l'ion est conservée sur la partie N-terminale du peptide et les ions fragments obtenus à faible énergie sont notés b_n , n étant un indice du nombre d'AA contenu dans le fragment
- soit par rupture d'une liaison en aval ou en amont d'une liaison peptidique. Dans ce cas, les ions fragments obtenus sont notés a_n ou c_n .

De même, les **fragments C-terminaux**, notés x_n , y_n et z_n font suite à la rupture d'une liaison peptidique ou rupture d'une liaison en son aval ou en son amont, et dans ce cas la charge de l'ion est conservée sur la partie C-terminale du peptide.

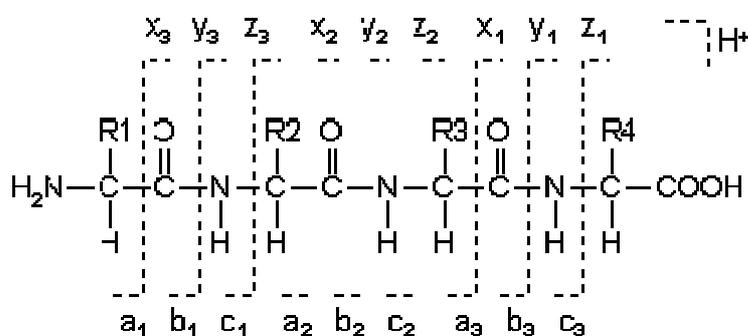
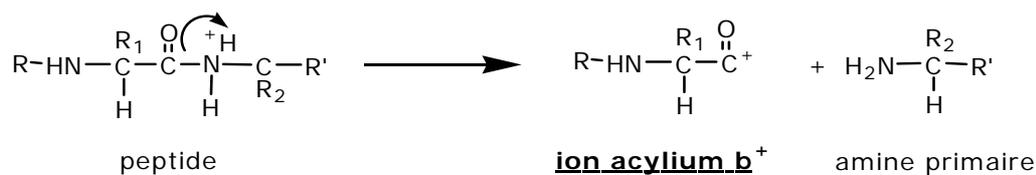


Fig. 35 : Nomenclature de la fragmentation peptidique en SM

La fragmentation SM des peptaïbols se fait à de faibles énergies d'ionisation et de fragmentation.

En milieu neutre elle conduit à la formation d'adduits Na^+ et d'ions bichargés, tandis qu'en milieu acide, on obtient essentiellement des ions acyliums RCO^+ stables notés b_n . Les ions ammoniums RNH_3^+ , notés y_n , n'y sont généralement pas observés (Fig. 36) (Hlimi, 1997 ; Auvin, 1999 ; Vinh, 1999 ; Payne *et al.*, 2000 ; Degenkolb *et al.*, 2003).

Ion acylium



Ion ammonium

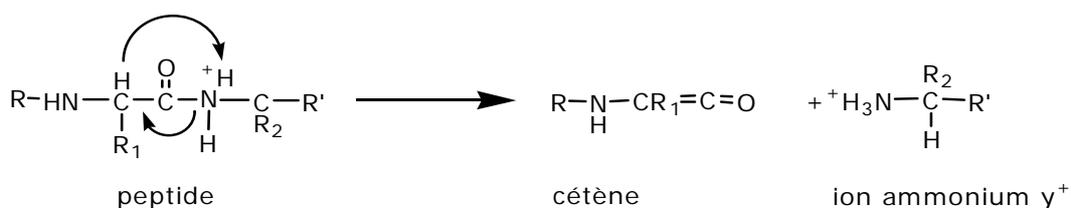


Fig. 36 : Formation des ions acyliums et ammoniums en SM (Hlimi, 1997).

1-2 Cas des peptides contenant le résidu Proline

Beaucoup de peptaïbols, si ce n'est leur totalité, contiennent un ou plusieurs résidus Proline (P) au niveau desquels surviennent préférentiellement des fragmentations. Ce phénomène s'explique par la plus grande basicité de l'atome d'azote de la P. Dans le cas des liaisons U-P (fréquentes dans les peptaïbols), le fort encombrement du carbone α,α -dialkylé de l'U associé accentue ce phénomène. Le peptide se fragmente selon deux voies en compétition (Fig. 37) ; La première fournit 2 ions complémentaires, un ion acylium N-terminal (noté N^+) et une molécule neutre, l'oligopeptide C-terminal. La seconde voie de fragmentation du peptide donne aussi 2 ions complémentaires ; un ion ammonium diprotoné C-terminal noté $[HC, H]^+$ correspondant à l'ion pseudomoléculaire de l'oligopeptide et une molécule neutre (Bidon-Duchand, 1993 ; Hlimi, 1997).

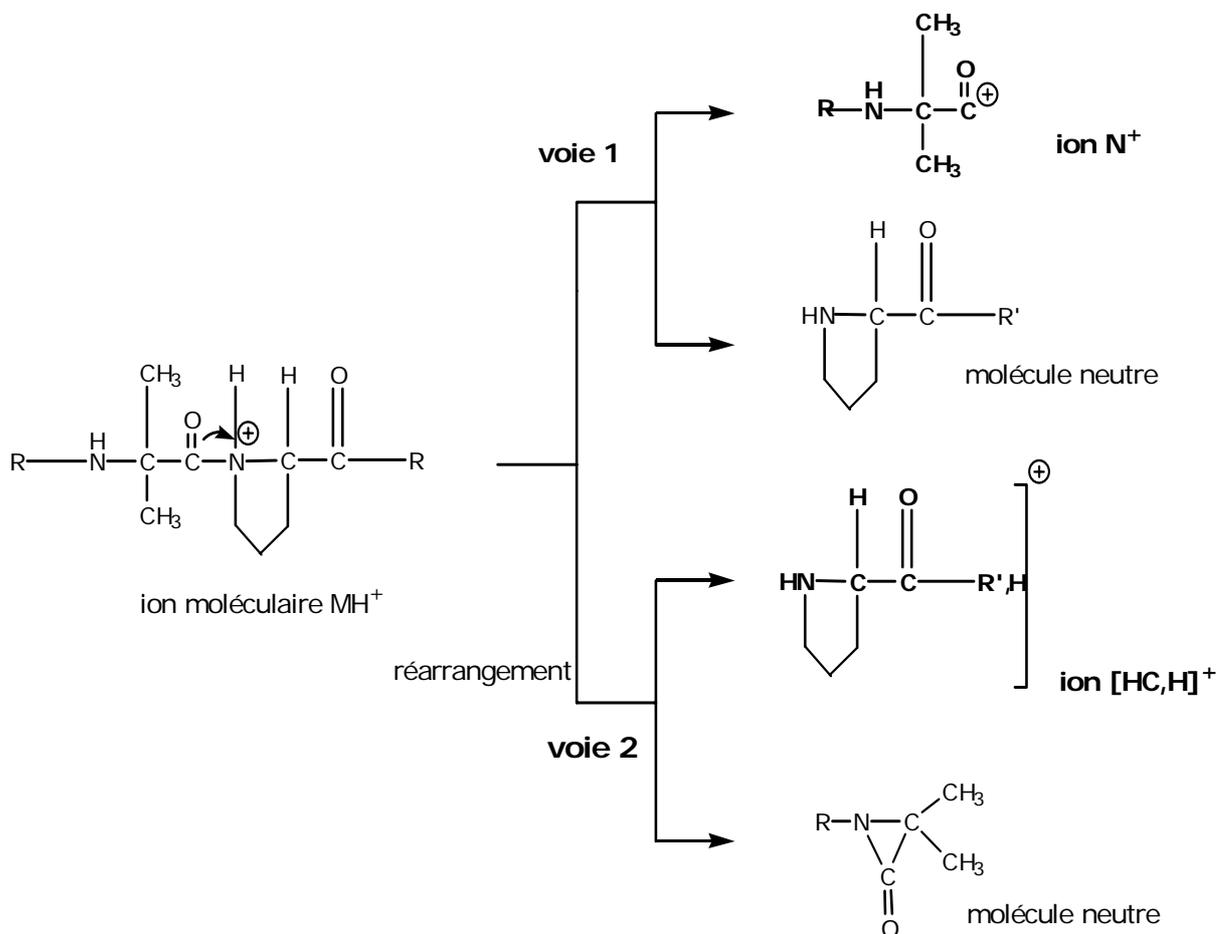


Fig. 37 : Clivage préférentiel de la liaison U-P (Hlimi, 1997).

1-3 Le traitement acidolytique en SM

Pour les peptaïbols, dans les conditions d'ionisation en milieu neutre, c'est **la voie 1**, formation d'ions RCO^+ , qui est favorisée (Fig. 37). La partie N-terminale est protonée au détriment de la C-terminale qui reste neutre, donc invisible en SM et sa fragmentation rendue de ce fait impossible (Przybylski *et al.*, 1984).

Le recours à l'acidification du milieu favorise la rupture des liaisons AA-Proline (X-P) qui sont fortement acido-labiles pour des raisons incertaines. Ce point de rupture, appelé de prédilection, casse préférentiellement l'ion pseudomoléculaire MH^+ en deux séries d'ions. La série N-terminale, correspondant aux ions acylium N-terminaux notés N^+ et la série C-terminale, d'abord neutre et instantanément protonée par le milieu acide pour former des ions ammonium C-terminaux $[\text{HC}, \text{H}]^+$ selon **la voie 2** (Fig. 37) et qui devient visible sur le spectre SM dans ce cas (Brückner et Jung, 1980 ; Brückner *et al.*, 1985 ; Leclerc *et al.*, 2001).

Les deux ions N^+ et $[\text{HC}, \text{H}]^+$ se fragmenteront ensuite à leur tour par perte des différents AA les composant (Bidon-Duchand, 1993 ; Hlimi, 1997).

C'est ainsi qu'en milieu acide, le spectre SM^2 met en évidence une série d'ions acyliums. Le calcul de la différence de masse entre ces ions consécutifs permet de déterminer la séquence peptidique.

L'acidification du milieu est obtenue à l'aide de l'acide acétique ou encore de TFA à une concentration voisine de 0.1 % (Brückner *et al.*, 1983 ; Brückner *et al.*, 1985). L'utilisation du TFA, acide fort, donne des résultats meilleurs car il augmente la conductivité des solutions utilisées (Niessen, 1999).

2- ISOMÉRIE DES ACIDES AMINÉS : RESOLUTION PAR CPG

L'analyse chromatographique des dérivées des acides aminés par CPG nous permet de différencier les AA isomériques contenus dans les peptaïbols (Leucine/Isoleucine, L/I ; Valine/Isovaline, V/J ; Leucinol/Isoleucinol, LOH/IOH ; Valinol/Isovalinol, VOH/JOH) par analyse de leurs hydrolysats acides (Oh *et al.*, 2000). A l'issue de cette méthode nous pourrions établir la totalité de la séquence des peptaïbols étudiés à l'exception de la différenciation des résidus Glutamine (Q) et Glutamate (E) qui produisent un dérivé identique lors de la dérivatisation, ce qui interdit donc toute discrimination (Brückner *et al.*, 1983 ; Brückner et Langer, 1990 ; Degencolb *et al.*, 2003).

Le principe de la méthode repose sur la comparaison du t_R des dérivés des AA par rapport aux t_R des composés de référence. Les peptaïbols sont hydrolysés pour la libération des AA, qui sont transformés en *N*-trifluoroacétylisopropylesters (EITA) pour les rendre volatils (Solfrizzo *et al.*, 1994) (cf. paragraphe 3-2-3, chapitre 3).

Nous avons donc d'abord établi une liste des t_R de référence des dérivés d'AA purs (cf. chromatogrammes et spectres CPG-SM-IE de référence, tome II, annexe 1, Figs. 38 à 44), pour ensuite déduire la composition en isomères des peptaïbols préalablement séquencés en ESI-MSⁿ.

3- PROTOCOLE D'IDENTIFICATION STRUCTURALE SUIVI DANS NOTRE ÉTUDE

La théorie du séquençage étant détaillée dans le paragraphe 1 de ce chapitre, en pratique il se fait selon les étapes suivantes :

- analyse des échantillons en milieu neutre (sans TFA) pour déduire la masse moléculaire (MM) des peptaïbols en repérant les adduits sodium mono $[M+Na]^+$ et bichargés $[M+2Na]^{2+}$ de la même molécule,

- analyse en milieu acidifié (+TFA) pour favoriser la rupture des liaisons peptidiques au niveau de la Proline (b_n), ce qui fait apparaître sur le spectre de masse les ions des parties N et C terminales souvent accompagné de l'ion $[M+H]^+$,
- isolement successif des parties terminales dans la trappe ionique et application d'une énergie supplémentaire pour les fragmenter en MS^2 , ce qui donne des séries d'ions appartenant à la partie terminale d'origine,
- calcul de la différence entre les valeurs m/z des ions de la même série. La différence entre deux ions correspond à la masse monoisotopique d'un résidu d'AA. Le calcul de ces différences de masse permet donc de connaître la séquence. Le tableau 7 regroupe les masses monoisotopiques des ions fragments, utiles pour la désignation des AA de la séquence (Bodo *et al.*, 1989 ; El Hajji *et al.*, 1987 ; Rebuffat *et al.*, 1991).
- recours à la MS^n , grâce à la trappe d'ions, quand la série d'ions naissant de la fragmentation des parties terminales est insuffisante pour établir la séquence. Les ions de seconde génération sont isolés et fragmentés en ions de 3^{ème}, 4^{ème} ou 5^{ème} génération, ce qui permet de compléter les séquences des parties terminales,
- juxtaposition de la séquence de la partie N-terminale à celle C-terminale pour établir la formule complète du peptaïbol analysé,
- analyse par GC-MS-EI pour compléter l'analyse structurale par la différenciation des isomères: Valine (V)/Isovaline (J) ; Leucine (L)/Isoleucine (I).
- utilisation de la base de données des peptaïbols (en ligne) (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home.shtml>) pour vérifier la cohérence ainsi que l'originalité des séquences finales établies.

Tableau 7 : Masses des résidus AA (monoisotopiques et moyennes) issus des peptaïbols (Biemann, 1990)

Acides aminés	Codes		Masse monoisotopique du résidu
	3 ltr	1 ltr	
acide α -amino isobutyrique (acide α , α -diméthyl amino acide = 2-alkylamino acides = α , α -dialkyl- α -amino acides = C $_{\alpha\alpha}$ -dialkylglycines)	Aib	U	85
Acetyl	Ac		43
Glycine	Gly	G	57
Alanine	Ala	A	71
Serine	Ser	S	87
Proline	Pro	P	97
Valine	Val	V	99
Isovaline	Iva	J	99
Threonine	Thr	T	101
Cysteine	Cys	C	103
Isoleucine	Ile	I	113
Leucine	Leu	L	113
Asparagine	Asn	N	114
Aspartic acid	Asp	D	115
Glutamine	Gln	Q	128
Lysine	Lys	K	128
Glutamic acid	Glu	E	129
Methionine	Met	M	131
Histidine	His	H	137
Phenylalanine	Phe	F	147
Arginine	Arg	R	156
Tyrosine	Tyr	Y	163
Tryptophan	Trp	W	186
Leucinol	LeuOH	LOH	116
Phenylalaninol	PheOH	FOH	150
Valinol	ValOH	VOH	102
Homoserine	Hse		101
Homoserine lactone	Hsl		83
Pyroglutamic acid	Glp		111
Carbamidomethylcysteine			160
Carboxymethylcysteine			161
Pyridylethylcysteine			208

4-2 Résultats du séquençage esi-it-sm des peptaïbols des 4 «souches groupes»

Les spectres MSⁿ détaillés du séquençage de tous les nouveaux peptaïbols que nous avons identifiés chez les 4 « souches groupes » sont illustrés dans l'annexe 2 du tome II. Ainsi les spectres de la souche :

- MMS 147 sont sur les figures 49 à 55,
- MMS 151 sont sur les figures 56 à 72,
- MMS 175 sont sur les figures 73 à 86,
- MMS 204 sont sur les figures 87 à 92.

Les peptaïbols connus et identifiés chez ces mêmes souches figurent en annexe 3 du tome II.

4-2-1 La souche MMS 147

Le *Trichoderma longibrachiatum* MMS 147 a été isolé des moules provenant de Tharon. Il produit 7 peptaïbols de longues séquences allant de 19 (peptides 2, 3 et 5) à 20 résidus (peptides 1, 4, 6 et 7) (tableau 9, annexe II, tome 2) avec un seul résidu Proline. La masse moléculaire de ces peptaïbols varie de 1851 à 1950 Da.

Parmi les 7 peptaïbols que produit cette souche, 4 sont déjà décrits et sont les trichokonine V (1865 Da), VI (1936 Da), VII et VIII (1950 Da), produits par un *Trichoderma koningii* Oudemans terrestre isolé de bois (Huang *et al.*, 1995a, b).

Le peptide 1 (1922 Da) est nouveau et est l'analogue le plus proche et non décrit de la trichokonine IIc avec une différence au niveau de la succession U4-A5 au lieu de A4-U5 (tableau 10, type 11).

Les peptides 2 et 3, également nouveaux (1851 Da), s'apparentent à la trichokonine V (1865 Da), déjà décrite et également produite par la souche marine MMS 147 (peptide 5).

Le peptide 2 en diffère par un seul AA, Alanine A3 au lieu de l'Aib U3 et le peptide 3 par le remplacement de V11 par L11 dans la trichokonine V (tableau 10, types 12 et 14).

Ces séquences sont caractérisées par des sites constants communs (SC), où l'on retrouve les mêmes AA dans les différents peptaïbols de la même souche.

Pour la MMS 147, on localise 8 SC pour les peptaïbols à 19 résidus (positions 1, 2, 13, 14, 15, 16, 18 et 19). Ceux à 20 résidus ont les mêmes SC en plus de la position 20 (tableau 11).

Chez les dix trichokonines connues on trouve 11 SC :
Q7, U8, V9, U10, G11, L12, P14, U16, Q18, Q19 et FOH20

Les peptides de cette souche avec 8 SC n'ont en commun avec les trichokonines que 4 sites : P14, U16, Q18 et Q19. Ceux à 9 SC ont en plus le FOH20. Ces sites se trouvent sur la partie N-terminale.

L'extrémité N-terminale de tous les peptaïbols de cette souche est un U acétylé, et celle C-terminale est constituée d'un Phénylalaninol (FOH).

Tableau 10 : Classement des peptaïbols à longue séquence des 4 souches marines de *Trichoderma* sp. en type et leur analogie avec les molécules connues (en)

Type	Analogie	MM	N-terminale	C-terminale	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Type 1*	<i>Trichokonine_VII</i>	1950	1163	787	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	-	P	V	U	J	Q	Q	FOH
	MMS 175 Peptide 8	1950	1163	787	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	I	U	-	P	V	U	V	Q	Q	FOH
Type 2*	<i>Trichokonine_VII</i>	1950	1163	787	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	-	P	V	U	V	Q	Q	FOH
	MMS 151 Peptide 3, MMS 204 Peptide 3 MMS 175 Peptide 4	1922	1163	760	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	-	P	V	U	A	Q	Q	FOH
Type 3	<i>Trichokonine_VI</i>	1936	1163	773	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	-	P	V	U	U	Q	Q	FOH
	MMS 19 peptide 1, MMS 151 peptide 5, MMS 175 peptide 1, MMS 204 peptide 4																									
Type 4	<i>Trichokonine_VIIb</i>	1950	1163	787	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	-	P	V	U	V	Q	Q	FOH
	MMS 19 peptide 2, MMS 147 peptide 7, MMS 151 peptide 6, MMS 204 peptide 5																									
Type 5*	<i>Trichokonine_VI</i>	1936	1163	773	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	-	P	V	U	U	Q	Q	FOH
	MMS 151 Peptide 2 idem MMS 175 peptide 7	1922	1149	773	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	V	U	-	P	V	U	U	Q	Q	FOH
Type 6	<i>Trichokonine_VIII</i>	1950	1177	773	Ac	U	A	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	-	P	V	U	U	Q	Q	FOH
	MMS 19 peptide 3, MMS 147 peptide 6, MMS 151 peptide 7																									
Type 7*	<i>Trichosporine_TS-B-IVd</i>	1950	1163	787	Ac	U	A	A	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	-	P	V	U	J	Q	Q	FOH
	MMS 151 Peptide 8	1964	1177	787	Ac	U	A	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	-	P	V	U	V	Q	Q	FOH
Type 7*	<i>Trichokonine_VII</i>	1950	1163	787	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	-	P	V	U	J	Q	Q	FOH
	MMS 151 Peptide 8	1964	1177	787	Ac	U	A	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	-	P	V	U	V	Q	Q	FOH
Type 8*	<i>Trichokonine_VIII</i>	1950	1177	773	Ac	U	A	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	-	P	V	U	U	Q	Q	FOH
	MMS 175 Peptide 9*	1950	1177	773	Ac	U	A	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	I	U	-	P	V	U	U	Q	Q	FOH
Type 9*	<i>Trichokonine_VI</i>	1936	1163	773	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	-	P	V	U	U	Q	Q	FOH
	MMS 151 Peptide 1 idem MMS 175 Peptide 2	1922	1149	773	Ac	U	A	U	A	A	A	Q	U	V	U	G	L	U	-	P	V	U	U	Q	Q	FOH

Tableau 11 : Sites des AA constants (en jaune) des peptaïbols de la souche

Position		Partie N terminale											Partie C terminale H+							Mw	[M+Na] ⁺	[M+2Na] ²⁺	Nom commun		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18					19	20
Fraction 1	peptide 1	Ac-U 128	A 199	A 270	U 355	A 426	A 497	Q 625	U 710	V 809	U 894	G 951	L 1064	U 1149	P 98	V 197	U 282	U 367	Q 495	Q 623	FOH 774	1922	1945	984	Nouveau anal. Trichokonine IIc
Fraction 2	peptide 2	Ac-U 128	A 199	A 270	A 341	U 426	Q 554	U 639	V 738	U 823	G 880	L 993		U 1078	P 98	V 197	U 282	U 367	Q 495	Q 623	FOH 774	1851	1874	948,5	Nouveau anal. Trichokonine V
	peptide 3	Ac-U 128	A 199	U 284	A 355	U 440	Q 568	U 653	V 752	U 837	G 894	V 993		U 1078	P 98	V 197	U 282	U 367	Q 495	Q 623	FOH 774	1851	1874	948,5	Nouveau anal. Trichokonine V
Fraction 3	peptide 4	Ac-U 128	A 199	U 284	A 355	U 440	A 511	Q 639	U 724	V 823	U 908	G 965	L 1078	U 1163	P 98	V 197	U 282	U 367	Q 495	Q 623	FOH 774	1936	1959	991	Trichokonine VI
	peptide 5	Ac-U 128	A 199	U 284	A 355	U 440	Q 568	U 653	V 752	U 837	G 894	L 1007		U 1092	P 98	V 197	U 282	U 367	Q 495	Q 623	FOH 774	1865	1888	955,6	Trichokonine V
Fraction 4	peptide 6	Ac-U 128	A 199	U 284	A 355	U 440	U 525	Q 653	U 738	V 837	U 922	G 979	L 1092	U 1177	P 98	V 197	U 282	U 367	Q 495	Q 623	FOH 774	1950	1973	998	Trichokonine VIII
	peptide 7	Ac-U 128	A 199	U 284	A 355	U 440	A 511	Q 639	U 724	V 823	U 908	G 965	L 1078	U 1163	P 98	V 197	U 282	V 381	Q 509	Q 637	FOH 788	1950	1973	998	Trichokonine VII

4-2-2 La souche MMS 151

Le *Trichoderma longibrachiatum* MMS 151 provient du Tharon et a été isolé de moules. Il produit une large gamme de 21 peptaïbols de longues (premier groupe) et de courtes séquences (second groupe).

Les peptaïbols du premier groupe sont constitués de 12 séquences longues (tableau 12, annexe II, tome 2) composées de 18 (peptides 10 à 12) à 20 résidus (peptides 1 à 9) avec un seul résidu Proline. Leur structure s'organise autour de la zone de clivage U12-P13 pour les peptaïbols à 18 AA ou U13-P14 pour les peptaïbols à 20 AA. Les peptides comportant 18 résidus (avec un résidu P13) présentent des fragments N et C terminaux réduits d'un AA par rapport aux peptaïbols à 20 AA (résidu P14). Ces peptaïbols ont une masse moléculaire qui varie de 1747 à 1964 Da et leur microhétérogénéité va de 2 à 4 séquences analogues par fraction CLHP.

Sur la totalité des 12 peptaïbols longs, 9 sont nouveaux avec 6 séquences à 20 résidus (peptides 1 à 4, 8 et 9), analogues de la trichokonine identifiée chez un *Trichoderma koningii* Oudemans terrestre isolé de bois (Huang *et al.*, 1995a, b).

Les 3 autres nouveaux peptaïbols sont à 18 résidus (peptides 10, 11 et 12) et s'apparentent à l'hypomurocine isolée d'une souche de *Trichoderma harzianum* (fournie par l'Institut de Fermentation à Osaka, Japon sous la référence IF 31288) (Becker *et al.*, 1997). Ces sont les seuls de cette souche à contenir un résidu Sérine (S).

Les peptides 5, 6 et 7, respectivement trichokonines VI (1936 Da), VIIb et VIII (1950 Da) sont des peptaïbols connus (tableau 10, type 3, 4 et 6).

Dans le paragraphe qui suit sont cités les peptaïbols de longue séquence produits par la MMS 151 ainsi que les peptaïbols avec lesquels ils présentent de fortes analogies (tableau 10, types 2 à 10 et 15 à 18).

On peut distinguer les peptaïbols déjà connus (peptides 5, 6 et 7), ceux qui ne diffèrent d'un composé déjà décrit que par un seul AA (peptides 1, 2, 3, 10 et 11) de ceux qui présentent des différences de 2 AA (peptides 4 et 9) ou 3 AA (peptide 12).

Le peptide 1 (1922 Da) diffère de la trichokonine VI (1936 Da) par le remplacement de l'Aib (U5) par l'Alanine (A5).

Le peptide 2 (1922 Da) diffère de la trichokonine VI par le remplacement de la Leucine L12 par la Valine V12.

Le peptide 3 (1922 Da) est l'analogue de la trichokonine VII (1950 Da) avec le remplacement de la V17 par l'A17.

Le peptide 4 (1922 Da) est l'analogue de la trichokonine VI (1936 Da) avec le remplacement de A4-U5 par U4-G5.

Le peptide 8 (1964 Da) peut être l'analogue aussi bien de la trichosporine_TS-B-IVd (en remplaçant A4 par U4 et J17 par V17) que celui de la trichokonine VII (en remplaçant A6 par U6 et J17 par V17).

Le peptide 9 (1964 Da) est l'analogue de la trichokonine VII (1950 Da) en remplaçant V9 par L9 et J17 par V17.

Le peptide 10 (1746 Da) est l'analogue de l'hypomurocine BII (1732 Da) en remplaçant U11 par L11 et également de l'hymprorocine BV (1747 Da) en substituant V11 par L11.

Le peptide 11 (1746 Da) est l'analogue de l'hypomurocine BII (1732 Da) avec le remplacement de U5 par V5.

Le peptide 12 (1760 Da) est analogue de l'hypomurocine BV (1746 Da) en remplaçant U5, J11 et LOH18 par V5, V11 et IOH18.

Les sites constants d'AA (SC) dans les peptides 1 à 9 de longue séquence (tableau 13) sont en 11 positions : U1, A2, Q7, U8, U10, G11, P14, U16, Q18, Q19 et FOH20. Pour les peptides 10 et 11, les 10 SC localisés sont en positions U1, Q7, U8, U10, G11, P14, U16, Q17, Q18 et LOH19.

L'extrémité N-terminale des peptaïbols longs de cette souche est composée d'un U acétylé. Celle C-terminale est constituée d'un FOH pour les peptides 1 à 9, un LOH pour les peptides 10 et 11, et enfin un IOH pour le peptide 12.

Le second groupe de peptaïbols produits par la souche MMS 151 est constitué de 9 peptaïbols de courte séquence (11 résidus, 1146 Da) (tableau 14, annexe II, tome 2) dont 8 sont nouveaux (peptide 1 à 8) en plus de la trichorovine TV-Ib déjà décrite (peptide 9).

Munis de deux Prolines (P6 et P10), ces peptaïbols sont présents en groupe microhétérogène complexe et concentrés dans une seule fraction CLHP.

Sur la figure 73 (annexe 2 du tome II) est représenté le graphe de filiation montrant les différentes étapes de la fragmentation MSⁿ, nous ayant conduit à l'identification de ces 9 séquences à courte chaîne.

Tableau 13: Sites des AA constants (en jaune) des peptaïbols longs de la souche

Position	Partie N terminale													Partie C terminale H+						Mw	[M+Na] ⁺	[M+2Na] ²⁺ /2	Apparenté à			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19					20		
Fraction 3	Peptide 1	Ac-U 128	A 199	U 284	A 355	A 426	A 497	Q 625	U 710	V 809	U 894	G 951	L 1064	U 1149	P 98	V 197	U 282	U 367	Q 495	Q 623	FOH 774	1922	1945	985	Nouveau	Anal.Trichokonine VI
	Peptide 2	Ac-U 128	A 199	U 284	A 355	U 440	A 511	Q 639	U 724	V 823	U 908	G 965	V 1064	U 1149	P 98	V 197	U 282	U 367	Q 495	Q 623	FOH 774	1922	1945	985	Nouveau	Anal.Trichokonine VI
Fraction 4	Peptide 3	Ac-U 128	A 199	U 284	A 355	U 440	A 511	Q 639	U 724	V 823	U 908	G 965	L 1078	U 1163	P 98	V 197	U 282	A 353	Q 481	Q 609	FOH 760	1922	1945	985	Nouveau	Anal.Trichokonine VII
	Peptide 4	Ac-U 128	A 199	U 284	U 341	G 426	A 497	Q 625	U 710	V 809	U 894	G 951	L 1064	U 1149	P 98	V 197	U 282	U 367	Q 495	Q 623	FOH 774	1922	1945	985	Nouveau	Anal.Trichokonine IV
Fraction 5	Peptide 5	Ac-U 128	A 199	U 284	A 355	U 440	A 511	Q 639	U 724	V 823	U 908	G 965	L 1078	U 1163	P 98	V 197	U 282	U 367	Q 495	Q 623	FOH 774	1936	1959	991	Trichokonine VI	
Fraction 6	Peptide 6	Ac-U 128	A 199	U 284	A 355	U 440	A 511	Q 639	U 724	V 823	U 908	G 965	L 1078	U 1163	P 98	V 197	U 282	V 381	Q 509	Q 637	FOH 788	1950	1973	998	Trichokonine VIIIb	
	Peptide 7	Ac-U 128	A 199	U 284	A 355	U 440	U 525	Q 653	U 738	V 837	U 922	G 979	L 1092	U 1177	P 98	V 197	U 282	U 367	Q 495	Q 623	FOH 774	1950	1973	998	Trichokonine VIII	
Fraction 7	Peptide 8	Ac-U 128	A 199	U 284	A 355	U 440	U 525	Q 653	U 738	V 837	U 922	G 979	L 1092	U 1177	P 98	V 197	U 282	V 381	Q 509	Q 637	FOH 788	1964	1987	1005	Nouveau	Anal.Trichosporine_TS-B-IVd et Trichokonine VII
	Peptide 9	Ac-U 128	A 199	U 284	A 355	U 440	A 511	Q 639	U 724	L 837	U 922	G 979	L 1092	U 1177	P 98	V 197	U 282	V 381	Q 509	Q 637	FOH 788	1964	1987	1005	Nouveau	Anal.Trichokonine VII
	Peptide 10	Ac-U 128	S 199	A 286	L 399	U 484	Q 612	U 697	V 796	U 881	G 938	L 1065	G 1122	P 98	L 211	U 296	U 381	Q 509	LOH 626			1746	1769	896	Nouveau	Anal. Hypomurocine B II&BV
	Peptide 11	Ac-U 128	S 199	A 286	L 399	V 498	Q 626	U 711	V 810	U 895	G 952	U 1037	U 1122	P 98	L 211	U 296	U 381	Q 509	LOH 626			1746	1769	896	Nouveau	Anal. Hypomurocine BII
Fraction 8	Peptide 12	Ac-U 128	S 215	A 286	L 399	V 498	Q 626	U 711	V 810	U 895	G 952	V 1051	U 1136	P 98	L 211	U 296	U 381	Q 509	IOH 626			1760	1783	903	Hypomurocine BV	

En fonction du nombre de leurs résidus, ces peptaïbols appartiendraient aux SF4, 5 et/ou 7 (Chugh et Wallace, 2001). Sachant que :

- La SF4 est composée de peptaïbols de 8 à 14 résidus, représentée principalement par les harzianines HC (produits par *T. harzianum*, dotés de 2 à 3 Prolines) et les pseudokonines KL III et KL VI. Ces derniers sont à 11 résidus, biosynthétisés par *T. pseudokoningii* et munis d'extrémités C-terminales inhabituelles, respectivement Proline amine P-NH₂ et anneau hydroxyketopiperazine (Rebuffat *et al.*, 1995 ; 2000).

- La SF5 comprend les lipopeptaïbols de 11 résidus principalement les trikoningines KA et KB de *T. koningii* (munis d'un octanoyl sur leur partie N-terminale) (Auvin-Guette *et al.*, 1993) et les trichogines A IV (produits par *T. longibrachiatum*), riches en Glutamine (G), dépourvus de Proline (P) et possédant un acide octanoïque sur l'extrémité N-terminale (Rebuffat *et al.*, 1995).

- La SF7 est constituée de lipopeptaïbols contenant un AA particulier, l' α ethylnorvaline (EtNor) et produit par *Tolypocladium geodes*, micromycètes terrestres des climats froids) munis d'une partie N-terminale acylée par un acide gras (octanoyl ou décanoyl) et un amino alcool (LOH) sur celle C-terminale. (Tsantrizos *et al.*, 1996)

A partir de ces éléments, il apparaît que les séquences courtes identifiées chez cette souche s'apparentent le mieux à la SF4, et dans laquelle nous proposons de les classer après les avoir baptisés trichobrachine A-I à IV quand ils comprennent une succession U9-P10 et trichobrachine B-I à IV quand cette succession est V9-P10.

Les peptaïbols courts biosynthétisés par la souche MMS 151 représentent 9 types de peptaïbols.

Les SC de ces petits peptaïbols sont en positions U1, N2, U5, P6 et P10 (tableau 15). Leur partie N-terminale est constituée d'un U acétylé et celle C-

terminale soit d'un LOH (peptides 1, 5, 6, 7 et 9) ou d'un VOH (peptides 2, 3, 4, 8).

Tableau 15 : Sites des AA constants (en jaune) des peptaïbols courts de la souche MMS 151

Position		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Mw	[M+Na] ⁺	[M+2Na] ^{2+/2}	Nom
Fraction 2	Peptide 1	Ac-U N	L	L	U	P	L	U	U	P	LOH	1146	1169	596	Trichobrachine A-I	
		128 242	355 468	553 650	763 848	933	1030	1146								
	Peptide 2	Ac-U N	L	L	U	P	V	L	U	P	VOH	1146	1169	596	Trichobrachine A-II	
		128 242	355 468	553 650	749 862	947	1044	1146								
	Peptide 3	Ac-U N	V	L	U	P	L	L	U	P	VOH	1146	1169	596	Trichobrachine A-III	
		128 242	341 454	539 636	749 862	947	1044	1146								
	Peptide 4	Ac-U N	L	V	U	P	L	L	U	P	VOH	1146	1169	596	Trichobrachine A-IV	
		128 242	355 454	539 636	749 862	947	1044	1146								
	Peptide 5	Ac-U N	L	L	U	P	V	U	V	P	LOH	1146	1169	596	Trichobrachine B-I	
		128 242	355 468	553 650	749 834	933	1030	1146								
	Peptide 6	Ac-U N	V	L	U	P	L	U	V	P	LOH	1146	1169	596	Trichobrachine B-II	
		128 242	341 454	539 636	749 834	933	1030	1146								
	Peptide 7	Ac-U N	L	V	U	P	L	U	V	P	LOH	1146	1169	596	Trichobrachine B-III	
		128 242	341 454	539 636	749 834	933	1030	1146								
	Peptide 8	Ac-U N	L	L	U	P	L	U	V	P	VOH	1146	1169	596	Trichobrachine B-IV	
		128 242	355 468	553 650	763 848	947	1044	1146								
	Peptide 9	Ac-U N	V	V	U	P	L	L	U	P	LOH	1146	1169	596	Trichorovine TV-Ib ou Ila	
		128 242	341 440	525 622	735 848	933	1030	1146								

3-2-3 La souche MMS 175

La souche MMS 175 est un *Trichoderma longibrachiatum* isolé de sédiments de surface prélevés à Port Giraud. Sa production en peptaïbols est importante (tableau 16, annexe II, tome 2) avec 9 peptides de 20 résidus dont 8 sont de nouveaux peptaïbols (peptides 2 à 9). Leur masse moléculaire varie de 1922 à 1950 Da et leur majorité est en mélange microhétérogène et sont de nouveaux analogues de la trichokonine. Les peptides 8 et 9 sont insolites par la présence de résidus Isoleucine I12.

Le peptide 1 (1936 Da) est une trichokonine VI (tableau 10, type 3).

Le peptide 2 (1922 Da) est l'analogue de la trichokonine VI avec le remplacement de l'U10 par l'A10 (tableau 10, type 19).

Le peptide 3 (1922 Da) est également l'analogue de la trichokonine VI avec le remplacement de l'U4 par l'A5 (tableau 10, type 9).

Le peptide 4 (1922 Da) est l'analogue de la trichokonine VII avec le remplacement de la V17 par la A17 (tableau 10, type 2).

Pour le peptide 5 (1922 Da), l'analyse des isomères (V/J, L/I) par GC-MS-EI n'étant pas validée, il peut être identique ou analogue du peptide 2 (tableau 10, type 19).

Le peptide 6 (1922 Da) est analogue avec la suzukacilline en remplaçant le C6 par l'A6 et le U9 par les Vx9 (tableau 10, type 21), alors que le peptide 7 (1922 Da) est l'analogue de la trichokonine VI en remplaçant la L12 par la V12 (tableau 10, type 5).

Le peptide 8 (1950 Da) est analogue avec la trichokonine VII en remplaçant la L12 par la I12 et la J12 par la V17 (tableau 10, type 1).

Le peptaïbols 9 (1950 Da) est analogue avec la trichokonine VIII en substituant la L12 par l'I12 (tableau 10, type 8).

Les positions constantes d'AA (tableau 17) se trouvent au début de la partie N-terminale en U1, A1, U3, A4, vers son milieu en Q7, U8, V9 et G11, et sur sa fin en U13 et P14. Sur la partie C-terminale ce sont les sites V15, U16, Q18, Q19 et FOH20.

L'extrémité N-terminale de tous les peptaïbols de cette souche est un U acétylé, et celle C-terminale est constituée d'un FOH.

Tableau 17 : Sites des AA constants (en jaune) des peptaïbols de la souche

Position		Partie N terminale															Partie C terminale H+				Mw	[M+Na] ⁺	[M+2Na] ²⁺	Nom commun
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19				
Fraction 1	Peptide 1	Ac-U A U A	U A	Q U V	U G	L	U P V U	U	Q Q FOH	1936	1959	991	Trichokonine VI											
		128 199 284 355	440 511	639 724 823	908 965	1078	1163 98 197 282	367	495 623 774															
Fraction 2	Peptide 2	Ac-U A U A	U A	Q U V	A G	L	U P V U	U	Q Q FOH	1922	1945	984	Nouveau											
		128 199 284 355	440 511	639 724 823	894 951	1064	1149 98 197 282	367	495 623 774				Anal. Trichokonine VI											
	Peptide 3	Ac-U A U A	A A	Q U V	U G	L	U P V U	U	Q Q FOH	1922	1945	984	Nouveau											
		128 199 284 355	426 497	625 710 809	894 951	1064	1149 98 197 282	367	495 623 774				Anal. Trichokonine VI											
	Peptide 4	Ac-U A U A	U A	Q U V	U G	L	U P V U	A	Q Q FOH	1922	1945	984	Nouveau											
		128 199 284 355	440 511	639 724 823	908 965	1078	1163 98 197 282	353	481 609 760				Anal. Trichokonine VII											
Fraction 3	Peptide 5	Ac-U A U A	U A	Q U Vx	A G	Lx	U P Vx U	U	Q Q FOH	1922	1945	984	Nouveau											
		128 199 284 355	440 511	639 724 823	894 951	1064	1149 98 197 282	367	495 623 774				Anal. Trichokonine VI											
	Peptide 6	AcU A U A	U G	Q U Vx	U G	Lx	U P Vx U	U	Q Q FOH	1922	1945	984	Nouveau											
		128 199 284 355	440 497	625 710 809	894 951	1064	1149 98 197 282	367	495 623 774				Unique											
	Peptide 7	Ac-U A U A	U A	Q U Vx	U G	Vx	U P Vx U	U	Q Q FOH	1922	1945	984	Nouveau											
		128 199 284 355	440 511	639 724 823	908 965	1064	1149 98 197 282	367	495 623 774				Anal. Trichokonine VI											
Fraction 4	Peptide 8	Ac-U A U A	U A	Q U V	U G	I	U P V U	V	Q Q FOH	1950	1973	998	Nouveau											
		128 199 284 355	440 511	639 724 823	908 965	1078	1163 98 197 282	380	508 636 788				Anal. Trichokonine VII											
Fraction 5	Peptide 9	Ac-U A U A	U U	Q U V	U G	I	U P V U	U	Q Q FOH	1950	1973	998	Nouveau											
		128 199 284 355	440 525	653 738 837	922 979	1092	1177 98 197 282	367	495 623 774				Anal. Trichokonine VIII											

3-2-4 La souche MMS 204

La souche MMS 204 a été isolée de sédiments de surface en provenance de la Baule et identifiée comme étant un *Trichoderma longibrachiatum*.

Sa production en peptaïbols est relativement faible, avec 2 peptides nouveaux sur un ensemble de 5 peptaïbols (tableau 18, annexe II, tome 2) de la famille des trichokonines et des suzukacillines. Ces derniers ont été isolés pour la première fois d'une souche de collection de *Trichoderma viridae* sous le forme d'un mélange microhétérogène (Brückner et Przybylski, 1984).

Leur masse moléculaire varie de 1922 à 1950 Da et leur nombre de résidus est de 20 avec un seul résidu proline en P14.

Les peptides connus que produit cette souche sont les 2, 4 et 5 (tableau 10, types 20, 2 et 3). Il s'agit respectivement de la suzukaciline (1922 Da), trichokonine VI (1936 Da) et VII (1950 Da).

Le peptide 1 (1922 Da) est nouveau et est analogue avec la trichokonine VI après substitution de la L12 par l'I12 (tableau 10, type 9)

Le peptide 3, également nouveau (1922 Da) est l'analogue de la trichokonine VII en remplaçant la V17 par l'A17 (tableau 10, type 2).

Les peptaïbols de la souche MMS 204 comprennent 17 sites d'AA en position constantes (tableau 19) : U1, A2, U3, A4, A6, Q7, U8, U10, G11, L12, U13, P14, V15, U16, Q18, Q19, FOH20.

L'extrémité N-terminale de tous les peptaïbols de cette souche est un U acétylé, et celle C-terminale est constituée d'un FOH.

Tableau 19 : Sites des AA constants (en jaune) des peptaïbols de la souche

	Partie N terminale									Partie C terminale H+										Mw	[M+Na] ⁺	[M+2Na] ²⁺	Nom commun	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19					20
Peptide 1	Ac-U	A	U	A	A	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	FOH	1922	1945	984	Nouveau
	128	199	284	355	426	497	625	710	809	894	951	1064	1149	98	197	282	367	495	623	774				Anal. Trichokonine VI
Peptide 2	Ac-U	A	U	A	U	A	Q	U	U	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	FOH	1922	1945	984	Suzukacilline
	128	199	284	355	440	497	625	710	809	894	951	1064	1149	98	197	282	367	495	623	774				
Peptide 3	Ac-U	A	U	A	U	A	Q	U	Vx	U	G	Lx	U	P	Vx	U	A	Q	Q	FOH	1922	1945	984	Nouveau
	128	199	284	355	440	511	639	724	823	908	965	1078	1163	98	197	282	353	481	609	760				Anal. Trichokonine VII
Peptide 4	Ac-U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	FOH	1936	1959	991	Trichokonine VI
	128	199	284	355	440	511	639	724	823	908	965	1078	1163	98	197	282	367	495	623	774				
Peptide 5	Ac-U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	V	Q	Q	FOH	1950	1973	998	Trichokonine VII
	128	199	284	355	440	511	639	724	823	908	965	1078	1163	98	197	282	381	509	637	788				

CONCLUSION

Les 4 souches fongiques étudiées et identifiées par J. Bissett comme étant des *Trichoderma longibrachiatum* (Bissett, 2004) produisent globalement 30 types de peptaïbols (dont 9 de courte chaîne) avec 24 nouvelles séquences.

Individuellement, la souche MMS 147 produit 7 peptaïbols avec 3 molécules nouvelles alors que la MMS 151 en synthétise 21 avec 12 peptaïbols longs dont 8 nouveaux ainsi que 9 de courtes séquences dont 8 sont originaux, baptisés trichobrachines A et B. Quant à la MMS 175, elle totalise la production de 9 peptaïbols dont 8 sont nouveaux alors que la MMS 204 a la plus faible production en peptaïbols avec seulement 2 nouvelles molécules sur un ensemble de 5 peptaïbols.

La nature des peptaïbols biosynthétisés par les 4 « souches groupes » se limite aux familles des trichokonines, des trichosporines, des hypomurocines, des trichorovines et des suzukacillines, sachant que la majorité des molécules produites sont de nouveaux analogues de ces familles.

La MMS 147 produit les trichokonines V, VI, VII, VIII et 3 nouveaux analogues. En plus de la trichokonine VI, la MMS 175 biosynthétise 8 nouveaux analogues de ce peptaïbol. Quant à la MMS 204, sa production se réduit à la suzukacilline, la trichokonine VI et VII et ses 2 nouveaux analogues.

La MMS 151 est remarquable pour son importante production en peptaïbols, un premier groupe à longue chaîne : les trichokonines VI, VII, VIII, l'hypomurocine BV et leurs nouveaux analogues et enfin un second groupe à courte chaîne : la trichorovine IIa ainsi que les trichobrachines A-I à A-IV et B-I à B-IV.

Malgré leur nombre important (30 types), la panoplie de peptaïbols produite par les 4 souches étudiées, appartenant seulement à 5 familles, est faiblement représentative de l'ensemble des familles de peptaïbols connues et qui compte 26 membres.

Par ailleurs, il s'avère que le nombre des sites d'AA constants dans les séquences est variable selon les souches. On repère 9 sites pour la MMS 147 tandis que pour la MMS 151 leur nombre varie selon les séquences entre 5, 10 et 11 sites. La MMS 175 et la MMS 204 présentent respectivement 15 et 17 positions constantes.

Ces éléments de différence montrent que chacune des souches marines étudiées possède un équipement de biosynthèse de peptaïbols spécifique pouvant ainsi la caractériser.

Les espèces du genre *Trichoderma* sont très difficiles à identifier. Les techniques modernes de la biologie moléculaire n'étant pas entièrement sélectives, l'analyse de la production de peptaïbols par les souches étudiées pourrait être exploitée comme outil taxonomique supplémentaire. Le principe reposerait sur la combinaison de techniques standardisées d'analyses moléculaires à celles morphologiques et métaboliques (dans notre cas la biosynthèse de peptaïbols). Il serait alors nécessaire de disposer d'un grand nombre d'isolats pour constituer une base de données de référence. L'étude ayant porté sur 4 souches seulement, il est difficile d'apporter des éléments constructifs sur cette question mais l'analyse d'autres souches, en cours au laboratoire, devrait permettre d'étayer ce sujet.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif principal de ce travail a été d'inventorier les peptaïbols les plus fréquemment rencontrés (idéalement tous) dans les zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire. Présentement partiel (étude portant sur 4 souches fongiques), cet inventaire pourrait être mené plus facilement à terme suite aux améliorations apportées aux méthodes pratiques.

Dans ce cadre, nous avons optimisé les conditions de production de peptaïbols, au niveau des techniques de fermentation, d'extraction et de purification (CLHP analytique et préparative). La méthodologie d'analyse structurale par SM et par CPG des fractions CLHP a également été améliorée.

Les résultats obtenus montrent que les souches de *Trichoderma* sp. présentes dans les sédiments des parcs conchylicoles produisent une très grande variété de peptaïbols, dont beaucoup n'ont pas été encore décrits, certains avec des chaînes peptidiques courtes, d'autres, en majorité, avec de longues chaînes. En outre, chaque souche fongique montre un profil « peptaïbols » qui lui est particulier. Cette caractéristique nous semble intéressante, d'une part d'un point de vue chimiotaxonomique et d'autre part concernant l'impact de ces mycotoxines sur les coquillages et sur leurs consommateurs.

Sur le plan chimiotaxonomique, les espèces du genre *Trichoderma* étant très difficiles à classer systématiquement, leur production de peptaïbols pourrait être exploitée comme outil taxonomique supplémentaire de différenciation. Une collaboration avec une unité de biologie moléculaire au Canada a été entamée dans ce sens au cours de ce travail.

Par ailleurs, l'étude de l'impact potentiel des peptaïbols sur la salubrité des coquillages alimentaire impliquerait d'abord la poursuite de l'identification d'autres peptaïbols pour en compléter l'inventaire.

Puis, le recours à la synthèse chimique pour contourner le problème du rendement des fermentations biologiques de ces peptides et de s'affranchir des étapes d'extraction et de séparation. Cette phase constitue l'essentiel d'un autre projet de collaboration, actuellement en démarrage au SMAB avec une unité italienne.

Enfin, la disponibilité de quantités suffisantes des nouveaux peptaïbols permettrait d'étudier leur bioactivité pour connaître l'incidence des ces contaminants naturels des zones aquacoles et de vérifier l'existence de liens avec les phénomènes de toxicités observées chez les coquillages de la régions des pays de la Loire et de même leurs conséquences sur la santé des consommateurs des produits de l'estran, principalement celle de l'Homme.

Bibliographie

AHMED, I. ; BISSETT, J. & MALLOCH, D.

Effect of phosphinothricin on nitrogen metabolism of *Trichoderma* species and its implications for their control of phytopathogenic fungi.

Pestic. Biochem. Physiol., 1995, 53 : 49-59

alberts, b. ; bray, d. ; johnson, a. ; lewis, j. ; raff, m. ; roberts, k. & walter, P.

L'essentiel de la biologie moléculaire, introduction à la biologie moléculaire de la cellule.

Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1999, 630 p.

AMZIL, Z. ; MARCAILLOU-LEBAUT, C. & BOHEC, M.

Unexplained toxicity in molluscs gathered in phytoplankton monitoring. In : Harmful and toxic alga blooms.

Sandai : YASUMOTO, T. ; OSHIMA, Y. & FUTOYO, Y., Int. Oceanogr. Com. of UNESCO, 1996, 543-546

Arx, E.V. ; Faupel, M. & Brugger, M.

Das 4,4'-Tetramethyldiamino-Diphenylmethan reagens (TDM) eine modifikation der Chlor-o-tolidin Farbereaktion für die Dünnschichtchromatographie.

J. Chromatogr. A, 1976, 120 (1) : 224-228

Atanassova, M. ; Choiset, Y. ; Dalgalarondo, M. ; Chobert, J.-M. ; Dousset X. ; Ivanova, I. & Haertlé, T.

Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. Int. J. Food Microbiol [en ligne]. 2003, Vol. 87, [consulté le 2 juillet 2004], p. 63-73. Disponible sur :

www.sciencedirect.com

Auvin, C.

Analyse structurale des toxines naturelles. Avancées récentes en spectrométrie de masse.

7ème rencontre en toxicologie : avancées biotechnologiques associées aux toxines, Paris, 2-3 décembre, 1999

Auvin-guette, C. ; REBUFFAT, S. ; VUIDEPOT, I. ; MASSIAS, M. & BODO, B.

Structural elucidation of trichonigins KA and KB, paptaiols from *Trichoderma koningii*.

J. Chem. Soc. Perk. T. 1, 1993, 3%F : 249-255

badia, a. & thibault, p.

Spectrométrie de masse 2, Spectrométrie de masse de biomolécules, Cours de Chimie bioanalytique avancée. Département de Chimie, Site de l'Université de Montréal [en ligne]. 2004 [Réf du 1 septembre 2005]. Disponible sur :

http://www.esi.umontreal.ca/~badiaa/CHM3102_MS2.pdf

Balshowsky, H.

Marine Species Molecular Database, for the use of fish species identification [base de données en ligne]. Nova (Floride, USA) : Nova southeastern university oceanographic center [réf. du 04 avril 1997]. Disponible sur : <http://www.nova.edu/ocean/dna/its.htm>

BECKER, D. ; KIESS, M. & BRÜCKNER, H.

Structures of peptaibol antibiotics hypomurocin A et B from the ascomycetous fungus *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto.

Liebigs Ann-Rech, 1997, 767-772

Benedetti, E. ; Bavoso, A. ; Di Blasio, B. ; Pavone, V. ; Pedone, C. ; Toniolo, C. & Bonora, G.M.

Peptaibol antibiotics : a study on the helical structure of the 2-9 sequence of emerimicins III and IV.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79 (24) : 7951-7954

BETINA, V.

Chromatographic methods as tools in the field of mycotoxins.
Chromatogr., 1989, 477 (2) : 187-233

Berg, A. ; Grigoriev, P.A. ; Degenkolb, T. ; Neuhof, T. ; Hartl, A. ; Schlegel, B. & Grafe U.
Isolation, structure elucidation and biological activities of trichofumins A, B, C and D, new 11 and 13 mer peptaibols from *Trichoderma* sp. HKI 0276W.
J. Pept. Sci., 2003, 9 (11-12) : 810-816

BEVEN, L. ; HELLUIN, O. ; MOLLE, G. ; DUCLOHIER, H. & WROBLEWSKI, H.
Correlation between anti-bacterial activity and pore sizes of two classes of voltage-dependent channel-forming peptides.
Biochim. Biophys. Acta, 1999, 1421 (1) : 53-63

Biemann, K. & Martin, S.A.

Mass spectrometric determination of the amino acid sequence of peptides and proteins.
Mass Spectrom. Rev., 1987, 6 (1) : 1-76

Biemann, K.

Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure.
Biomed. Environ. Mass Spectrom., 1988, 16 (1-12) : 99-111

Biemann, K.

Mass spectrometry of peptides and proteins.
Annu. Rev. Biochem, 1992, 61 : 977-1010

Biemann, K.

Methods in Enzymology.

San Diego : McCloskey, J. A., Academic Press, 1990, Vol. 193, 888 P. Disponible sur :
<http://www.rmsb.u-bordeaux2.fr/rmsb/Informations/ms/AA-masses.html>

Bidon-Duchamp, S.

Peptides antibiotiques des *Trichoderma* sp., les peptaïbols. Structure et activité de l'Harzianine MA II.
Th. : Pharmacie : Paris XI : 1993 ; 80, 84 p.

Bissett, J.

A revision of the genus *Trichoderma*. L. Section *Longibrachiatum* Sect. Nov.
Can. J. Bot., 1984, 62 : 924-931

Bissett, J.

Commentaires de l'adresse internet suivante :

http://www.res2.agr.ca/ecorc/personnel/biss_j_f.htm [courrier électronique]

Destinataire : MOHAMED-BENKADA, M.

Vendredi, 22 octobre 2004, 17 :52

Communication personnelle

BissetT, J.

A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Pachybasium*.
(a) Can. J. Bot., 1991, 69 : 2373-2417

BissetT, J.

A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification.

(b) *Can. J. Bot.*, 1991, 69 : 2357-2372

blumenthal, c.z.

Production of peptide metabolites in *Aspergillus niger*, *A. oryzae* and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul. Toxicol. pharmacol.*, 2004, 39 (2) : 214-228

BODO, B. ; REBUFFAT, S. & El-Hajji, M.

Helical conformation of trichorzianines in solution.

Proceedings 20th European Peptide Symposium, september 1988

Berlin : Walter de Gruyter & Co. Peptides, 1988, 354-356

BOHEIM, G. ; IRMSCHER, G. & JUNG, G.

Trichotoxin A-40, a new membrane exciting peptide, Part B: voltage-dependent pore formation in bilayer lipid membranes and comparison with other alamethicin analogues.

Biochim. Biophys. Acta, 1978, 507 (2) : 485-506

bouchet, p. ; guignard, j.-l. ; pouchus, y.f. & villard, J.

Les champignons : mycologie fondamentale appliquée.

Paris : Masson, 2005, pp. 109-112, 191 p.

BREWER, D. ; GREENWELL, M. & TAYLOR, A.

Studies of *Trichoderma* sp. isolates from *Mytilus edulis* collected on the shores of cape breton and Prince Edward islands.

Proc. N. S. Inst. Sci., 1993, 40 (1) : 29-40

Brisou, J.

La microbiologie du milieu marin : Les levures et les champignons du milieu marin.

Paris : Flammarion Médicales (collection de l'institut Pasteur), 1975, pp 159-162, 271 p.

Brückner, H. & Jung, G.

Identification of N-acetyl- α -aminoisobutyric acid after selective trifluoroacetolysis of Alamethicin and related peptide antibiotics.

Chromatographia, 1980, 13 (3) : 170-174

Brückner, H. ; Jung, G. & Przybylski, M.

Chromatographic and mass spectrometric characterization of the structure of the polypeptide antibiotics samarosporin and stillbellin and identity with Emerimicin.

Chromatographia, 1983, 17 (12) : 679-685

Brückner, H. ; Graf, H.

Paracelsin, a peptide antibiotic containing alpha-aminoisobutyric acid, isolated from *Trichoderma reesei* Simmons. Part A.

Experientia, 1983, 15,39 (5) :528-530

Brückner, H. ; Graf, H. & Bokel, M.

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, 1984, 40 (11) : 1189-1197

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.

(a) J. Chromatogr. A, 1984, 296 : 263-275

Brückner, H. & Przybylski, M.

Methods for the rapid detection, isolation and sequence determination of "peptaibols" and other Aib-containing peptides of fungal origin.

(b) Chromatographia, 1984, 19 : 188-199

Brückner, H. ; könig, w.a. ; aydin, m. & jung, g.

Trichotoxin A40- Purification by counter currents distribution and sequencing of isolated fragments. Biochem. Biophys. Acta, 1985, 827 (1) : 51-62

Brückner, H. ; BOSCH, I. ; GRASER, T. & FÜRST, P.

Determination of α -alkyl- α -amino acids and α -amino alcohols by Chiral Phase Capillary Gas Chromatography and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography.

(a) J. Chromatogr. A, 1987, 395 : 569-590

Brückner, H. ; BOSCH, I. ; GRASER, T. & FÜRST, P.

Determination of non-protein α -alkyl- α -amino acids by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography in comparison with Ion-Exchange and Capillary Gas Chromatography.

(b) J. Chromatogr. A, 1987, 386 : 251-272

Brückner, H. ; Gerhlein, B. & Kieb, M.

The polypeptide mycotoxin paracelsin from Trichoderma reesei: Scaled-up isolation and possible consequences.

In Biochemical Engineering- A challenge for interdisciplinary cooperation.

(c) Stuttgart : H. Chmiel, W.P. Hammes & J.E. Baily, Gustav-Fischer-Verlag, 1987, pp 450-453

Brückner, H. ; KUSSIN, T. & KRIPP, T.

Detection of new peptaibol antibiotics (mycotoxins) in species and strains of the fungal genus Trichoderma.

Chemistry and Biology, tenth American symposium (10 ; 1987 ; Saint Louis)

(d) St. Louis (USA) : Peptides, 23-28 mai, 1987, XXIII, pp 650-652, 690 p.

Brückner, H. & Langer, M.

Gas chromatographic separation of diastereomeric esters of α -alkyl- α -amino acids on dimethylpolysiloxane.

J. Chromatogr. A, 1990, 521 (1) : 109-121

Brückner, H. ; KRIPP, T. & KIEB, M.

Sequencing a new Aib-peptides by Tandem Mass Spectrometry and automated Edman degradation.

European Peptide Symposium (21 ; 1991 ; Leiden)

Leiden (Hollande) : Giralt, E., Andreu, D. ESCOM Science Publishers B.V., 1991, pp 347-350

Brückner, h. ; kirschbaum, j. & jaworski, a.

(a) Sequences of peptaibol antibiotic trichoareocins from Trichoderma aureoviride.

European peptide society and John Wiley and sons Ltd.

European peptide symposium (27 ; 2002 ; Sorrento)

Sorrento : 31 août au 02 septembre, 2002

Brückner, h. ; winzheimer, r.k. & kirschbaum, j.

(b) Alamethicin sequence reconsidered.

European peptide society and John Wiley and sons Ltd.

European peptide symposium (27 ; 2002 ; Sorrento)

Sorrento : 31 août au 02 septembre, 2002

- Brückner, H. & Koza, A.
Solution phase synthesis of the 14-residue peptaibol antibiotic trichovirin I.
Amino Acids, 2003, 24 : 311-323
- bunkoczi, g. ; schiell, m. ; vértesy, l. & sheldrick, a.
Crystal structures of cephaibols.
J. Pept. Sci., 2003, 9 (11-12) : 745-752
- CAFISO, D.S.
Alamethicin: a peptide model for voltage gating and protein-membrane interactions.
Annu. Rev. Biophys. Struct., 1994, 23 : 141-165
- chutrakul, c. & peberdy j.f.
Isolation and characterisation of a partial peptide synthetase gene from *Trichoderma asperillum*.
FEMS Microb. Lett., 2005, 252 (2) : 257-265
- COLL, J.C. & BOWDEN, B.F.
The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures.
J. Nat. Prod., 1986, 49 (5) : 934-936
- COLE, R.B.
Electrospray ionisation mass spectrometry, fundamentals, instrumentation and applications.
New York : John Wiley & sons Inc., 1997, 577 p.
- Cooney, J.M. ; Lauren, D.R. & Perry-Meyer, L.J.
A novel tubular bioassay for measuring the production of antagonistic chemicals produced at the fungal/pathogen interface.
Letters in Applied Microbiology, 1997, 24 (6) : 460-462
- cournut, B.
Le genre *Trichoderma* hyphomycètes.
Th. : Pharmacie : Marseille : 1984 ; 77 p.
- Cosette, P. ; Rebuffat, S. ; Bodo, B. & Molle, G.
The ion-channel activity of longibrachins LGA I and LGB II: effects of Pro-2/Ala and Gln-18/Glu substitutions on the alamethicin voltage-gated membrane channels.
Biochim. Biophys. Acta Biomembranes, 1999, 1461 (1) : 113-122
- CHUGH, J.K. & WALLACE, B.A.
Paptaibols: models for ion channels.
Biochem. Soc. Trans., 2001, 49 (4) : 565-570
- CHUGH, J.K. ; BRÜCKNER, H. & WALLACE, B.A.
Model of helical bundle channel based on the high resolution crystal structure of trichotoxin_A50E.
Biochemistry, 2002, 41 : 12934-12941
- CUOMO, V. ; PALOMBA, I. ; PERRETTI, A. ; GUERRIERO, A. ; D'AMBROSIO, M. & PIETRA, F.
Antimicrobial activities from marine fungi.
J. Mar. Biotechnol., 1995, 2 : 199-204
- DAS, M.K. ; KRISHNA, k. & BALARAM, P.

Membrane modifying action of four peptide components of anti amoebic, a microheterogeneous fungal antibiotic.

Indian J. Biochem. Biophys., 1988, 25 : 560-565

Dathe, M. ; Kaduk, C. ; Tachikawa, E. ; Melzig, M.F. ; Wenschuh, H. & Bienert, M.
Proline at position 14 of alamethicin is essential for hemolytic activity, catecholamine secretion from chromaffin cells and enhanced metabolic activity in endothelial cells.

Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes, 1998, 1370 (1) : 175-183

DAVID, J.S. & VICKERMAN, C.

Fast Atom Bombardment Quadrupole Mass Spectrometry.

J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1981, 324-325

De vasson, b.

L'huître, l'invitée du réveillon.

Loire Atlantique, le magazine du Conseil Général, 2002, 26 : 34

DOGENKOLB, t. ; BERG, A. GAMS, W. ; SCHLEGEL, b. & gräfe, U.

The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions.

J. Pept. Sci., 2003, 9 (11-12) : 666-678

DEMAIN, A.L. & FANG, A.

The natural functions of secondary metabolites.

Adv. Biochem. Eng., Biotechnol., 2000, 69 : 1-39

Dib, R. ; Chobert, J.-M. ; Dalgalarondo, M. ; Barbier, G. & Haertlé T.

Purification, molecular properties and specificity of a thermoactive and thermostable proteinase from *Pyrococcus abyssi*, strain st 549, hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal ecosystem.

FEBS Lett. [en ligne], 1998 [réf. du 17 juillet 1998], 431 : 279-284. Disponible sur www1.elsevier.com

DUCLOHIER, H. ; ALDER, G. ; kociolek, k. & leplawy, m.t.

Channel properties of template assembled alamethicin tetramers.

J. Pept. Sci., 2003, 9 (11-12) : 776-783

DUCLOHIER, H. ; ALDER, G.M. ; BASHFORD, C.L. ; BRÜCKNER, H. ; CHUGH, J.K. & WALLACE, B.K.

Conductance studies on Trichotoxin_A50E and implications for channel structure.

Biophys. J., 2004, 87 (5) : 1705-1710

EL HAJJI, M. ; REBUFFAT, S. ; LECOMMANDEUR, D. & BODO, B.

Isolation and sequence determination of trichorzianines A antifungal peptides from *Trichoderma harzianum*.

Int. J. Pept. Prot. Res., 1987, 29 : 207-215

Enjalbal, C. ; Martinez, J. & Aubagnac, J.-L.

Mass spectrometry in combinatorial chemistry.

Mass Spectrom. Rev., 2000, 19 (3) : 139-161

EPAND, R.M. ; SHAI, Y. ; SEGREST, J.P. & ANANTHARAMAIAH, G.M.

Mechanisms of the modulation of membrane bilayer properties by amphipathic helical peptides.

Biopolymers, 1995, 37 : 319-338

EPAND, R.F. ; EPAND, R.M. ; formaggio, f. ; crisma, m. ; wu, h. ; lehrer, r.i. & toniolo, C.

Analogs of the antimicrobial peptide trichogin having opposite membrane properties.
Eur. J. Biochem., 2001, 268 : 703-712

Esser, K. & Lemke, P.A.
The mycota, volume VII: systematics and evolution, part A.
Berlin : Springer-Verlag Cop., 2001, 366 p.

esposito, e. & silva, m.
Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*.
Crit. Rev. Microbiol., 1998, 24 (2) : 89-98

Fenical, W. & JENSEN, P.
Marine fungi: A developing focus in marine natural products chemistry.
Euroconference on marine natural products (1 ; 1997 ; Athènes)
Athènes : novembre, 2-6, 1997

Fik, E. ; Dalgalarondo, M. ; Haertle, T. & Gozdicka-Jozefiak, A.
Comparative biochemical analysis of lectin and nuclease from *Chelidonium majus* L.
Acta Biochim. Pol. [en ligne]. 2000, Vol. 47 (2) [consulté le 2 juillet 2004], p. 413-420 Disponible
sur : http://www.actabp.pl/2_2000.html

fonderiz, r.i. ; lopez, m.g. ; garcia-sancho, j. & garcia, a.g.
Alamethicin channel permeation by Ca²⁺, Mn²⁺ and Ni²⁺ in bovine chromaffin cells.
FEBS, 1991, 283 (1) : 89-92

FOX, r.o. & richards, f.m.
A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1,5-Å
resolution.
Nature, 1982, 300 : 325-330

Frisvad, J.C. & filtenborg, O.
Classification of Terverticillate penicillia based of profiles of mycotoxins and other secondary
metabolites.
App. Environ. Micorb., 1983, 46 (6) : 1301-1310

Frisvad, J.C.
Mycotoxigenic moulds.
The international mycological congress (4 ; 1990 ; Regensburg)
Regensburg (Germany) : international mycological association, 28 août au 3 septembre, IIE-230-
/1, 1990

Frisvad, J. C. & Samsom, R.A.
Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. Handbook of
applied mycology, Volume 3, Foods and Feeds, Dekker, M.
New York : arora, d.k., mukerji, K.g. & marth, e.h., 1991, pp 31-68.

GAMS, W. & BISSETT, J.
Morphology and identification of *Trichoderma* sp. *Trichoderma* & *Gliocladium*, Volume 1: Basic
Biology, Taxonomy and Genetics.
Londres : Kubicek, C.P. ; Harman, G.E. & ONDIK, K.L., CRC Press, 1998, pp. 3-34, 300 p.

Gareth-Jones, E.B. & ALIAS, S.A.
Biodiversity of tropical microfungi. In: Biodiversity of mangrove fungi.
Hong-Kong : Hyde K.D., University Press, 1997, pp 71-92

Gareth-Jones E.B.

Biofutur, juin 1998, numéro spécial N° 179, pp 18-20

Gareth-Jones E.B. ; YONGCHENG, L. ; wU, X. ; ZHOU, X. & VRIJMOED, L.L.P.

Marine and mangrove fungi: a unique source of new bioactive compounds. International Symposium of Swansea (1990 ; Swansea)

Bioactive fungal metabolites, impact and exploitation,

Swansea : British Mycological Society, 22-27 avril 2001, pp.2, 109 p.

Gates, P.

Electrospray Ionisation (ESI). The [Cambridge University](http://www.methods.ch.cam.ac.uk/meth/ms/theory/esi.html)

Mass Spectrometry WWW Server [en ligne]. 1999 [réf. du 11 avril 2003]. Disponible sur :

<http://www-methods.ch.cam.ac.uk/meth/ms/theory/esi.html>

genilloud, o. ; pelaez, f. ; gonzalez, i. & diez, m.t.

Diversity on actinomycetes and seaweeds from the Iberian coasts.

Microbiologia, 1994, 10 : 413-422

GENIN, E.

Les sources à pression atmosphérique en spectrométrie de masse. La gazette du laboratoire [en ligne]. Décembre 1995 [consulté le 08 juin 2004]. Disponible sur :

<http://www.gazettelabo.fr/2002archives/pratic/1995/3finnigan.htm>

[Goulard, C.](#) ; [Hlimi, S.](#) ; [Rebuffat, S.](#) & [Bodo, B.](#)

Trichorzins HA and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*

I. Fermentation, isolation and biological properties.

[J. Antibiot.](#), 1995, 48 (11) :1248-1253

Grayson,

Michael Gross Research Group. 51st ASMS Conference Abstracts and Postershttp [en ligne].

Montreal, 2003. Disponible sur :

http://www.chemistry.wustl.edu/~msf/ASMS2003/Mike_Grayson_abstract_2003.pdf

GRIGORIEV, P.A. ; KRONEN, M. ; SCHLEGEL, B. ; HARTL, A. & GRAFE, U.

Differences in ion-channel formation by ampullosporins B, C, D and semisynthetic desacetyltryptophanyl ampullosporin A.

Bioelectrochemistry, 2002, 57 (2) : 119-121

Grigoriev, P.A. ; Schlegel, B. ; Kronen, M. ; Berg, A. ; Härtl, A. & Gräfe, U.

Differences in membrane pore formation by peptaibols. J. Pept. Sci. [en ligne]. 2003, Vol. 9 (11-12)

, [réf. du 5 novembre 2003], p. 763-768. Disponible sur : <http://www.interscience.wiley.com>

Grondona, I. ; HERMOSA, R. ; TEJADA, M. ; GOMIS, M.D. ; MATEOS, P. S. ; BRIDGE, P. D. ;

MONTE, E. & GARCIA-ACHA, I.

Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens.

App. Environ. Microb., 1997, 63 (8) : 3189-3198

Grovel, O.

La gliotoxine métabolite cytotoxique d'une souche d'*Aspergillus fumigatus* de zone conchylicole : mise en évidence, production en milieu marin, développement de méthodes de détection et d'évaluation.

Th. : Pharmacie : Nantes : 2002, 272 p.

gutiérrez, a. ; florencio, r. ; ezpeleta, C. ; cisterna, r. & martinez, m.

Trichoderma pseudokoningii as a cause of fatal infection in a bone marrow transplant recipient.

Clin. Infect. Dis., 1995, 20 : 1063-1064

haris, p.i. ; molle, g. & duclouhier, h.

Conformational changes in alamethicin associated with substitution of its α -Methylalanines with Leucines : a FTIR spectroscopic analysis and correlation with channel kinetics.

Biophys. J., 2004, 86 (1) : 248-253

HIGASHIMOTO, Y. ; KODAMA, H. ; JELOKHANI-NIARAKI, M. ; KATO, F. & KONDO, M.

Structure-function relationship of model Aib-containing peptides as ion transfer intermembrane templates.

J. Biochem., 1999, 125 : 705-712

HLIMI, S.

Peptides antibiotiques d'origine fongique. Isolement de nouveaux peptaïbols, études structurales, relation structure/activité membranaire et antibiotique.

Th.D. : Spectrochimie : Université Pierre et Marie Curie Paris VI : 1997, 168 p.

HUANG, Q. ; TEZUKA, Y. ; KIKUCHI, T. ; NISHI, A. ; TUBAKI, K. & TANAKA, K.

Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. II. Metabolites of *Trichoderma koningii*.

(a) Chem. Pharm. Bull., 1995, 43 (2) : 223-229

HUANG, Q. ; TEZUKA, Y. ; HATATANAKA, Y. ; KIKUCHI, T. ; NISHI, A. & TUBAKI, K.

Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. IV. Minor peptaïbols of *Trichoderma koningii*.

(b) Chem. Pharm. Bull., 1995, 43 (10) : 1663-1667

HUGHES, G., C.

Studies of fungi in oceans and estuaries since 1961. 1. Lignicolous, Caulicolous and Follicolous species.

Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., 1975, 13 : 69-180

HYDE, K.D. ; GARETH-JONES, E.B. ; LEANO, E. ; POINTING, S.B. ; POONYTH, A.D. & VRIJMOED, L.L.P.

Role of fungi in marine ecosystems.

Biodivers. Conserv., 1998, 7 : 1147-1161

IIDA, A. ; UESATO, S. ; SHINGU, T. ; OKUDA, M. ; NAGAOKA, Y. ; KURODA, Y. & FUJITA, T.
Fungal metabolites. Part 6. Nuclear magnetic resonance study of antibiotic peptides, Trichosporin Bs, from *Trichoderma polysporum*.

Chem. Soc. Perk. Trans. 1, 1993, 367-373

IIDA, a. ; sanekata, m. ; wada, s.-l. ; fujita, t., tanaka, h. ; enoki, a. ; fuse, g. ; kanai, m. & asami, k.
Fungal metabolites. Part 18. New membrane- modifying peptides, Trichorozins I-IV, from the fungus *Trichoderma harzianum*.

Chem. Pharm. Bull., 1995, 43 (3) : 392-397

IIDA, a. ; MIHARA, T. ; FUJITA, T. & TAKAISHI, Y.

Peptidic immunosuppressants from the fungus *Trichoderma polysporum*.

Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, 9 : 3393-3396

Jaworski, A. ; MAISCH, A. & Brückner, H.

Reversal of the elution order of microheterogenous peptide antibiotics on a fluorocarbon column.

GIT Spezial Chrom., 1998, 2 : 86-89

Jaworski, A. & Brückner, H.

Detection of new sequences of peptaïbol antibiotics trichotoxins A-40 by on-line liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry.

J. Chromatogr. A., 1999, 862 : 179-189

Jaworski, A. & Brückner, H.
New sequences and new fungal producers of peptaibol antibiotics anti amoebins
J. Pept. Sci., 2000, 6 (4) : 149-167

Jaworski, A. & Brückner, H.
Sequences of polypeptide antibiotics stilboflavins, natural peptaibol libraries of the mold *Stilbella flaviceps*.
J. Pept. Sci., 2001, 7 (8) : 433-447

JOHNSON, R.S. & BIEMANN, K.
The primary structure of Thioredoxin from *Chromatium vinosum* determined by High Performance Liquid Tandem Mass Spectrometry.
Am. Chem. Soc., 1987, 26 (5) : 1209-1214

Jung, G. ; König, W.A. ; Leibfritz, D. ; Ooka, T. ; Janko, K. & Boheim, G.
Structural and membrane modifying properties of suzukacillin, a peptide antibiotic related to alamethicin. Part A. Sequence and conformation.
Biochim. Biophys. Acta Biomembranes, 1976, 433 (1) : 164-181

KANAI, M. ; IIDA, A. ; NAGAOKA, Y. ; WADA, S. & FUJITA, T.
Fungal metabolites. XXI. Characteristics of low energy collision induced dissociation of $[M+2H]^+$, $[M+H+Na]^+$ and $[M+2Na]^+$ for peptaibols using electrospray ion-ionization mass spectrometry.
J. Mass Spectrom., 1996, 31 : 177-183

KAZMI, S. & KRULL, I.S.
Proteomics and the current state of protein separations sciences, part two.
PharmaGenomics, Oct/Nov, 2001, 18-27

kelsh, I.p. ; ellena, j.f. & cafiso, d.s.
Determination of molecular dynamics of Alamethicin using ^{13}C NMR: implications for the mechanism for gating of a Voltage-Dependent Channel.
Biochemistry, 1992, 31 : 5136-5144

Khudyakova, Y.V. ; PIVKIN, M.V. ; KUZNETSOVA, T.A. & SVETASHEV, V.I.
Fungi in sediments of the sea of Japan and their biologically active metabolites.
Microbiology, 2000, 69 (5) : 722-726

Kitagawa, S. ; Tachikawa, E. ; Kashimoto, T. ; Nagaoka, Y. ; Iida, A. & Fujita, T.
Asymmetrical membrane fluidity of bovine adrenal chromaffin cells and granules and effect of trichosporin-B-Via.
Biochim. Biophys. Acta, 1998, 1375 (1) : 93-100

Kleinkauf, H. & Rindfleisch, H.
Non ribosomal biosynthesis of the cyclic octadecapeptide alamethicin.
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1975, 22 : 411-418

Kohlmeyer, J.
New genera and species of higher fungi from the deep sea (1615-5315 m).
Rev. Mycol., 1977, 41 : 189-206

Kohlmeyer, J. & Kohlmeyer, E.
Marine mycology: the higher fungi.
New York : Academic press, 1979, 689 p.

Kohlmeyer, J.
Geography of marine fungi.
Aust. J. Bot. Suppl. Ser., 1983, 10 : 67-76

Kohlmeyer, J. & Kohlmeyer, E.
Decomposition of mangrove wood by marine fungi and teredinids in Belize.
Mar. Ecol., 1995, 16 (1) : 27-39

Kropacheva, T.N. & Raap, J.
Ion transport across a phospholipid membrane mediated by the peptide trichogin GA IV.
Biochim. Biophys. Acta, 2002, 1567 (1-2) : 193-303

Kubicek, C.P. ; BISSETT, J. ; DRUZHININA, I., KULLNIG-GRADINGER, C. & SZAKACS, G.
Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma* sp.: a case study on South-East Asian isolates.
Fungal Genet. Biol., 2003, 38 (3) : 310-319

Lafont, R.
Biologie et Multimédia, UFR de Biologie, Université Pierre et Marie Curie, Paris
[réf. du 28 juin 2005]. Disponible sur : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/spectro/C4.html>

Landreau, A.
Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii* Oudemans isolée du milieu marin : Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture.
Th. : Pharmacie : Nantes : 2001, 201 p.

Landreau, A. ; POUCHUS, Y.F. ; SALLENAVE-NAMONT, C. ; BIARD, J.-F. ; BOUMARD, M.C. ; ROBIOU DU PONT, T. ; MONDEGUER, F. ; GOULARD, C. & VERBIST, J.-F.
Combined use of LC/MS and a biological test for a rapid identification of marine mycotoxins produced by *Trichoderma koningii*.
J. Microbiol. Meth., 2002, 48 (2-3) : 181-194

LEE, S.-J. ; YEO, W.-H. ; YUN, B.-S. & YOO, I.-D.
Isolation and sequence analysis of new peptaibol, Boletusin from *Boletus* spp.
J. Pept. Sci., 1999, 5 (8) : 374-378

Leclerc, G. ; Rebuffat, S. ; Goulard, C. & Bodo, B.
Directed biosynthesis of peptaibol antibiotics in two *Trichoderma* strains. I. Fermentation and isolation.
(a) J. Antibiot., 1998, 51(2) :170-177

Leclerc, G. ; Rebuffat, S. ; Goulard, C. & Bodo, B.
Directed biosynthesis of peptaibol antibiotics in two *Trichoderma* strains. II. Structure elucidation.
(b) J. Antibiot., 1998, 51 (2) :178-183

LECLERC, G. ; GOULARD, C. ; PRIGENT, Y. ; BODO, B. ; WROBLEWSKI, H. & REBUFFAT, S.
Sequence and antimycoplamic properties of longibrachins LGB II and LGB III, two novel 20-residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*.
J. Nat. Prod., 2001, 64 (2) : 164-170

Le Mapihan, K.
Caractérisation et classification des phases stationnaires utilisées pour l'analyse CPL des produits pharmaceutiques.
Th. : ESPCI: Université de Paris VI : 2004, 274 p.
Disponible sur: <http://pastel.paristech.org/archive/00000908/01/TheseKLM.pdf>

Leuchtmann, A. ; petrini, o. & samuels, g.

- Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*.
Mycologia, 1996, 88 (3) : 384-394
- Liberra, K. & Lindequist, U.
Marine fungi – A prolific resource of biologically active natural products.
Pharmazie, 1995, 50 : 583- 588
- Lillard-Roberts, S.
Trichoderma harzianum. Mold-Help [en ligne].2004 [consulté le 21 octobre 2004]. Disponible sur :
<http://mold-help.org/content/view/431/>
- Lucaciu, M. ; REBUFFAT, S. ; GOULARD, C. ; DUCLOHIER, H. ; MOLLE, G. & BODO, B.
Interaction of the 14-residue peptaibols, herzianins HC, with lipid bilayers: permeability modifications and conductance properties.
Biochim. Biophys. Acta, 1997, 1323 (1) : 85-96
- MARAHIEL, M. ; KESSLER, N. & LINNE, U.
Demain des antibiotiques à façon?
La Recherche, 2003, n° 370, pp. 54-58
- Matsunaga, S. & Fusetani, N.
Nonribosomal peptides from marine sponges.
Curr. Org. Chem., 2003, 7 : 945-966
- MATSUURA, K. ; YESILADA, A. ; LIDA, A. ; TAKAISHI, Y. & KANAI, M.
Fungal metabolites. Part 8. Primary structures of antibiotic peptides Hypelcin A-I, A-II, A-III, A-IV, A-V, A-VI, A-VII, A-VIII and A-IX from *Hypocrea peltata*.
Chem. Soc. Perk. Trans. 1, 1993 : 381-387
- Matsuzaki, K. ; Nakai, S. ; Handa, T. ; Takaishi, Y. ; Fujita, T. & Miyajima, K.
Hypelcin A, an α -aminoisobutyric acid containing antibiotic peptide, induced permeability change of phosphatidylcholine bilayers.
Biochemistry, 1989, 28 (24) 9392-9398
- Miller, J.D.
Marine mycology, a practical approach.
Hong Kong: Hyde, K.D. & Pointing, S.B. Fungal Diversity Press, 2000, pp. 158-171
- miller, s.l.
Functional diversity in fungi.
Can. J. Bot., 1994, 73 (Suppl. 1) : S50-S57
- morris, h.r. & panico, m.
Fast atom bombardment: A new mass spectrometric method for peptide sequence analysis.
Biochem. Biophys. Res. Co., 1981, 101 (2) : 623-631
- MOSS, S.T.
The biology of marine fungi.
New York : Cambridge University Press, 1986, pp. 62, 382 p.
- munoz, f.m. ; demmler, g.j. ; travis, w.r. ; ogden, a.k. ; rossmann, s.m. & rinaldi, m.g.
Trichoderma longibrachiatum infection in a pediatric patient with aplastic anemia.
J. Clin. Microbiol., 1997, 35 (2) : 499-503
- NIESSEN, W.M.A.
Liquid chromatography mass spectrometry.

New York : Marcel Dekker Inc., 1999, 634 p.

NIR-PAZ, R. ; PREVOST, M.-C. ; NICOLAS, P. ; BLANCHARD, A. & WROBLEWSKI, H.
Susceptibilities of *Mycoplasma hyorhinis* to membrane-active peptides and enrofloxacin in human tissue cell cultures.

Antimicrob. Agents Ch., 2002, 46 (5) : 1218-1225

OH, S.U. ; LEE, S.J. ; KIM, J.H. & YOO, I.D.

Structural elucidation of new antibiotic peptides, atroviridin A and C from *Trichoderma atroviridae*.
Tetrahedron Lett., 2000, 41 : 61-64

OKUDA, M. ; IIDA, A. ; UESATO, S ; NAGAOKA, Y. ; FUJITA, T. ; TAKAISHI, Y. & TERADA, H.
Fungal metabolites. X. The effect of peptide antibiotics Trichosporin-Bs, on the respiratory activity of mitochondria.

Biol. Pharm. Bull., 1994, 17 : 482-484

O'reilly, A. & Wallace, B.A.

The peptaibol antiameobin as a model ion channel: similarities to bacterial potassium channels.

J. Pept. Sci., 2003, 9 (11-12) : 769-775

Oren, Z. & Shai, Y.

Mode of action of linear amphipatic α -helical antimicrobial peptides.

Biopolymers, 1998, 47 (6) : 451-563

pang, k.-l. ; gareth-jones, e.b. & vrijmoed, l.l.p.

Two new marine fungi from China and Singapore, with the description of a new genus, *Sablecola* (Halosphaerales, Ascomycota).

Can. J. Bot., 2004, 82 : 485-490

Papavizas, G.C.

Trichoderma and *Gliocladium* : Biology, ecology and potential for biocontrol.

Ann. Rev. Phytopathol., 1985, 23 : 23-54

Pavlovicova, R.

Secondary metabolites of the fungus *Trichoderma viridae*.

Mycologia, 1998, 53 : 267-275

Payne, H. ; CHELF, J.H. & GLISH, G.L.

C-terminal peptide sequencing using acetylated peptides with MSn in a Quadrupole Ion Trap.

Analyst, 2000, 125 : 635-640

PELLETIER, S.W. ; CHOKSHI, H.P. & DESAI, H.K.

Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography.

J. Nat. Prod., 1986, 49 (5) : 892-900

Peltola, J. ; Ritieni, A. ; Mikkola, R. ; Grigoriev, P.A. ; Pócsfalvi, G. ; Andersson, M.A. & Salkinoja-Salonen, M.S.

Biological effects of *Trichoderma harzianum* peptaibols on mammalian cells.

Appl. Environ. Microb., 2004, 70 (8) :4996-5004

Peters, j.e. ; catalfomo, p. ; constantine, g.h. & KIRK, P.W.

Free amino acids in higher marine fungi.

J. Pharm. Sci., 1975, 3D64 (3D.) : 176-177

PETIT, K.E.

Nouveaux médicaments d'origine marine : Etude chimique et pharmacologique des métabolites bioactifs du micromycète saprophyte *Penicillium waksmanii* et du cnidaire *Rhytisma fulvum*.
Th. : Pharmacie : Université de Nantes, 2003, 169 p.

Pivkin, M. V.
Filamentous fungi associated with holoturians from the Sea of Japan, off the Primorye coast of Russia.
Biol. Bull., 2000, 198 (1) : 101-109

Pocsfalvi, G. ; RITIENI, A. ; FERRANTI, P. ; RANDAZZO, G. ; VEKEY, K. & MALORNI, A.
Microheterogeneity characterization of paracelin mixture from *Trichoderma reesei* using high-energy collision-induced dissociation Tandem Mass Spectrometry.
Rapid Commun. Mass Spectrom., 1997, 11 (8) : 922-930

Pocsfalvi, G. ; SCALA, F. ; Lorito, M. ; ritieni, a. ; RANDAZZO, G. ; FERRANTI, P. ; VEKEY, K. & MALORNI, A.
Microheterogeneity characterization of a Trichorzianine-A mixture from *Trichoderma harzianum*.
J. Mass Spectrom., 1998, 33 (2) : 154-163

polglase, j.l. ; alderman, D.j. & richards, r.h.
Aspects of the progress of mycotic infections in marine animals, In: *The biology of marine fungi*.
Londres : Moss, S.T., Cambridge University Press, 1986, pp. 155-164.

Prieto, A. ; Leal, J.A. ; Poveda, A. ; Jiménez-Barbero, J. ; Gómez-Miranda, B. ; Domenech, J. ; Ahrazem, O. & Bernabé, M.
Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *Hypocrea* species.
[Carbohydrate Research](#), 1997, **304** (3-4) : 281-291

Przybylski, M. ; dietrich, i. ; manz, i. & brückner, H.
Elucidation of structure and microheterogeneity of the polypeptide antibiotics paracelsin and trichotoxin A-50 by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry in combination with selective in situ hydrolysis.
Biomed. Mass Spectrom., 1984, 11 (11) : 259-582

ragnaud, j.m. ; marceau, C. ; roche-bezian, m.c. & wone, C.
Infection péritonéale à *Trichoderma koningii* sur dialyse péritonéale continue ambulatoire.
Med. Maladies Infect., 1984, N° 7-8 : 402-405

Rebuffat, S. ; Prigent, Y. ; Auvin-Guette, C. & Bodo, B.
Tricholongins BI and BII, 19 residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. Solution structure from two dimensional NMR spectroscopy.
Eur. J. Biochem., 1991, 201 (3) : 661-674

Rebuffat, S. ; Goulard, C. & Bodo, B.
Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*: harzianins HC, proline-rich 14-residue peptaibols.
J. Chem. Soc. Perk. T. 1, 1995, 3%F : 1849-1855

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 (10) : 519-533

reiber, k. ; neuhof, t. ; ozegowski, j.h. ; döhren, h.v. & schweck, t.

A nonribosomal paptide synthetase involved in the biosynthesis of ampullosporins in *Sepedonium ampullosporum*.

J. Pept. Sci., 2003, 9 (11-12) : 701-713

Rifai, M.A.

A revision of the genus *Trichoderma*.

Mycol. Papers, 1969, 116 : 1-56

Rindfleisch, H. & KleiNkauf, H.

Biosynthesis of alamethicin.

Febs Lett., 1976, 62 (3) : 276-280

RoePstorff, P. & Fohlman, J.

Proposal for a common nomenclature for sequence ions mass in mass spectra of peptides.

Biomed. Mass Spectrom., 1984, 11 : 601

Rohrmann, S. ; LORENZ, R. & MOLITORIS, H.P.

Use of natural and artificial seawater for investigation of growth, fruit body production, and enzyme activities in marine fungi.

Can. J. Bot., 1992, 70 : 2106-2110

roquebert, m.-f.

Interactions antagonistes des *Trichoderma* sp. dans les systèmes telluriques : Systématique, biologie et écologie des organismes.

Compte-rendu des 4èmes Rencontres en Toxinologie, Paris, 1996, 13-15

rouessac, f. & rouessac, A.

Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes. 3ème édition

Paris : Masson, 1996, pp. 263-300, 372 p.

Sallenave, C.

Etude de la flore fongique des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire, recherche de souches toxigènes.

Th. : Pharmacie : Université de Nantes, 1999, 194 p.

Sallenave-Namont, C. ; Pouchus, Y.F. ; Robiou du Pont, T. ; Lassus, P. & Verbist, J.-F.

Toxicogenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas.

Mycopathologia, 2000, 149 (1) : 21-25

Samuels, G. J. ; Petrini, O. & Manguin, S.

Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph.

Mycologia, 1994, 86 : 421-435

Schaumann, K.

Marine pilze. In : Mikrobiologie des meeresbodens. Meyer-Reil L.A. und Köster M.

Jena : Gustav Fischer Verlag, 1993, 144-195

sandgren, m. ; stahlberg, j. & mitchinson, c.

Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes.

Prog. Biophys. Mol. Bio., 2005, 89 : 246-291

Sansom, M.S.P.

Alamethicin and related peptaibols- model ion channels.

Eur. Biophys. J., 1993, 22 (2) :105-124

Schirmböck, M. ; LORITO, M. ; WANG, Y.L. ; HAYES, C.K. ; ARISAN-ATAC, I. ; SCALA, F. ; HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P.

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. Microb., 1994, 4364-4370

shenkarev, z.O. ; Paramonov, a.s. ; balashova, t.a ; yakimenko, Z.A. ; baru, m.b. ; mustaeva, l.g. ; raap, j. ; ovchinnikova, T.v. & arseniev, A.s.

High stability of the hinge region in the membrane-active peptide helix of zervamicin: paramagnetic relaxation enhancement studies.

Biochem. Biophys. Res. Comm., 2004, 325 (3) : 1099-1105

SCHWARZER, D. ; MOOTZ, H.D. & MARAHIEL, L.A.

Exploring the impact of different thioesterase domains for the design of hybrid peptide synthetases.

Chem. Biol., 2001, 8 (10) : 997-1010

seguin, p. ; degeilh, b. ; grulois, i. ; gacouin, a. ; maugendre, s., dufour, T. ; dupont, b. & camus, c. Successful treatment of a brain abscess due to *Trichoderma longibrachiatum* after surgical resection.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis, 1995, 14 : 445-448

Sharman, G.J. ; TRY, A.C. ; WILLIAMS, D.H. ; AINSWORTH, A.M. ; BENeyto, R ; gibson, T.M. ; McNicholas, c. ; RENNO, D.v. ; Robinson, N. ; WOOD, K.A. & WRIGLEY, S.K.

Structural elucidation of XR586, a peptaibol like antibiotic from *Acremonium persicinum*.

Biochem. J., 1996, 320 : 723-728

Solfrizzo, M. ; Altomare, C. ; Visconti, A. ; Bottalico, A. & Perrone, G.

Detection of peptaibols and their hydrolysis products in cultures of *Trichoderma* species.

Nat. Toxins., 1994, 2 (6) :360-365

solliec, G.

Recherche par PCR d'OsHV-1 (Ostreid Herpesvirus type 1) dans des échantillons d'eau de claires ostréicoles.

Mémoire de fin d'études. Ecole Pratique des Hautes Etudes, Sciences de la Vie et de la Terre.

Montpellier, 2004, 51 p.

SOLIMAN, K.M. & BADEAA, R.I.

Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi.

Food Chem. Toxicol., 2002, 40 (11) : 1669- 1675

SOMMERER, N.

Spectrométrie de masse des biomolécules. Site de l'INRA [en ligne]. 1996 [réf. mars, 2004].

Disponible sur : <http://www.inra.fr/Internet/Centres/Dijon/aromes/spectro/ms-b.htm>

SRIDHAR, K.R. & PRASANNARAI, K.

Biogeography and biodiversity of higher marine fungi in tropics- A review.

Ecol. Env. & Cons., 2001, 7 (3) : 219-234

Stanley, S.J.

Observation on the seasonal occurrence of marine endophytic and parasitic fungi.

Can. J. Bot., 1992, 70 : 2089-2096

Steyn, P.S.

Mycotoxins, general view, chemistry and structure.

Toxicol. lett., 1995, 82-83 : 843-851

subramanian, C.V.

Hyphomycetes. Taxonomy and Biology.

Londres : Academic Press Inc., 1983, pp. 340-347, 502 p.

Sugiyama, J.

Pleomorphic fungi: the diversity and its taxonomic implications.

Tokyo: Elsevier, 1987, pp. 29-56, 325 p.

Tachikawa, E. ; Takahashi, S. ; Furumachi, K. ; Kashimoto, T. ; IIDA, A. ; Nagaoka, Y. ; Fujita, T. & Takaishi, Y.

Trichosporin-B-III, an alpha-aminoisobutyric acid-containing peptide, causes Ca²⁺ -dependent catecholamine secretion from adrenal medullary chromaffin cells.

Mol. Pharmacol., 1991, 40 (5) : 790-797

Tachikawa, E. ; Takahashi, S. ; MiZUMA, K. ; Kashimoto, T. ; Nagaoka, Y. ; IIDA, A. ; & Fujita, T.
Properties of Trichosporin-B-VI a. Induced catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells.

Biol. Pharm. Bull., 1995, 18 : 1165-1167

Tachikawa, E. ; NOGOMORI, K., Takahashi, S. ; MiZUMA, K. ; ITOH, K. ; Kashimoto, T. ; Nagaoka, Y. ; IIDA, A. & Fujita, T.

Pathway for Ca²⁺ influx into cells by Trichosporin-B-VI a, an α -amino isobutyric acid-containing peptide, from the fungus *Trichoderma polysporum*.

Biochem. Biophys. Acta, 1996, 1282 (2) : 140-148

Targett, N. M. ; Kilcoyne, J. P. & Green, B.

Vacuum liquid chromatography: an alternative to common chromatographic methods.

J. Org. Chem., 1979, 44 (26) : 4962-4964

tanis, b.c. ; van der pijl, h. ; van ogtrop, m.l. ; kibbelaar, r.e. & chang, p.c.

Fatal fungal peritonitis by *Trichoderma longibrachiatum* complicating peritoneal dialysis.

Nephrol. Dial. Transpl., 1995, 10 (1) : 114-116

TIELEMAN, D.P. ; BERENDSEN, H.J.C. & SAMSON, M.S.P.

An alamethicin channel in a lipid bilayer: Molecular dynamics simulations.

Biophys. J., 1999, 76 (4) : 1757-1769

Tieleman, D.P. ; Berendsen, H.J.C. & Sansom, M.S.P.

Voltage-dependent insertion of Alamethicin at phospholipid/water and octane/water interfaces.

Biophys. J., 2001, 80 (1) : 331-346

Toniolo, C. & Borona, G. M.

Preferred conformations of peptides containing alpha, alpha-disubstitued alpha-amino acids.

Biopolymers, 1983, 22 : 205-215

Tsantrizos, Y.S. ; Pischos, S. ; Sauriol, F. & Widden, P.

Peptaibol metabolites of Tolypocladium geodes.
Can. J. Chem., 1996, 74 (2) : 165-172

verbist, j.-f.
Marine fungal substances in: Studies in natural products chemistry.
Londres : Elsevier Sciences B.V., 2000, 24 : 979-1092

Vinh, J.,
Les fiches : sigles et techniques de la spectrométrie de masse. CJSM : le Club des Jeunes Spectrométristes de Masse [en ligne]. 1998 [Réf. du 07 octobre 2002]. Disponible sur www.cjasm.espci.fr/cjasm_fiches.html

VINH, J.
Etude et caractéristique structurale de modification post-traductionnelle de la tubuline par spectrométrie de masse : la polyglycylation et la polyglutamylation.
Th. : Sciences biologiques fondamentales appliquées : Paris 6 : 1999, 265 p.

vining, l.c.
Fonctions of secondary metabolites.
Annu. Rev. Microbiol., 1990, 44 : 395-427

Vishwakiran, Y. ; THAKUR, N.L. ; RAGHUKUMAR, S. ; YENNAWAR, P.L. & ANIL, A.C.
Spatial and temporal distribution of fungi and wood-borers in the coastal tropical waters of Goa, India.
Bot. Mar., 2001, 44 : 47-56

Vizcaino, J.A. ; Sanz, L. ; Cardoza, R.E. ; Monte, E. & Gutierrez, S.
Detection of putative peptide synthetase genes in Trichoderma species: Application of this method to the cloning of a gene from T. harzianum CECT 2413.
FEMS Microb. Lett., 2005, 244 : 139-148

VOET, D. & VOET, J.G.
Biochimie.
Paris, Bruxelles : DeBoeck Université, 1998, pp. 56-69, 1360 p.

WADA, S.-I. ; IIDA, A. ; AKIMOTO, N. ; KANAI, M. ; TOYAMA, N. & FUJITA, T.
Fungal metabolites XIX. Structural elucidation of channel-forming peptides, trichorovins-I_XIV, from the fungus Trichoderma viridae.
Chem. Pharm. Bull., 1995, 43 (6) : 910-915

WADA, S.-I. & tanaka, r.
A novel 11-residual peptaibol-derived carrier for in vitro oligodeoxynucleotide delivery into cell.
Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004, 14 (10), 2563-2566

watson, j.t.
Introduction to mass spectrometry, 2nd edition.
New York : Raven Press, 1985, 351 p.

WEBER, T. & MARAHIEL, M.A.
Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases.
Structure, 2001, 9 : R3-R9

Wiest, A. ; Grzegorski, D. ; Xu, B.-W. ; Goulard, C. ; Rebuffat, S. ; Ebbole, D.-J. ; Bodo, B. & Kenerley, C.

Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase
J. Biol. Chem., 2002, 277 (23) : 20862-20868

Wilhelm, C. ; Anke, H. ; Flores, Y. & Sterner, O.

New peptaibols from *Mycogone cervina*.

J. Nat. Prod., 2004, 67 (3) : 466-468

Widden, P. & Abitbol, J.J.

Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil.

Mycologia, 1980, 72 : 775-784

Yun, B.-S. ; Yoo, I.-D. ; Kim, Y.-H. ; Kim, Y.-S. ; Lee, S.-J. ; Kim, K.-S. & Yeo, W.H.

Peptaivirins A and B, two new antiviral peptaibols against TMV infection.

Tetrahedron Lett., 2000, 41 (9) : 1429-1431

ZHAO, M. & BADA, J.L.

Extra terrestrial amino acids in Cretaceous/Tertiary boundary sediments at Stevns Klint, Denmark.

Nature, 1989, 339 : 463-465

Annexes

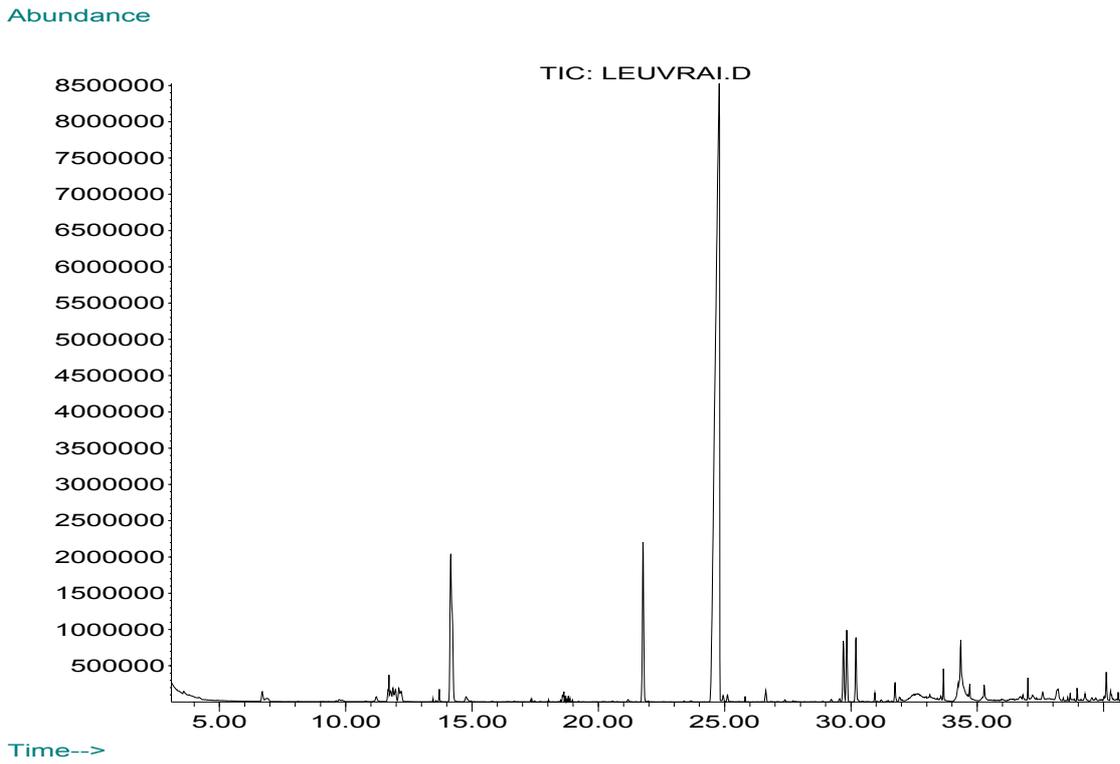
Annexe 1

Analyse des acides aminés par CPG-SM-IE

Acides aminés de référence (Figs. 38-44)

Exemples de l'Isovaline (J), la Valine (V), la Leucine (L) et l'Isoleucine (I) de peptaïbols (Figs. 45-48)

(a)



(b)

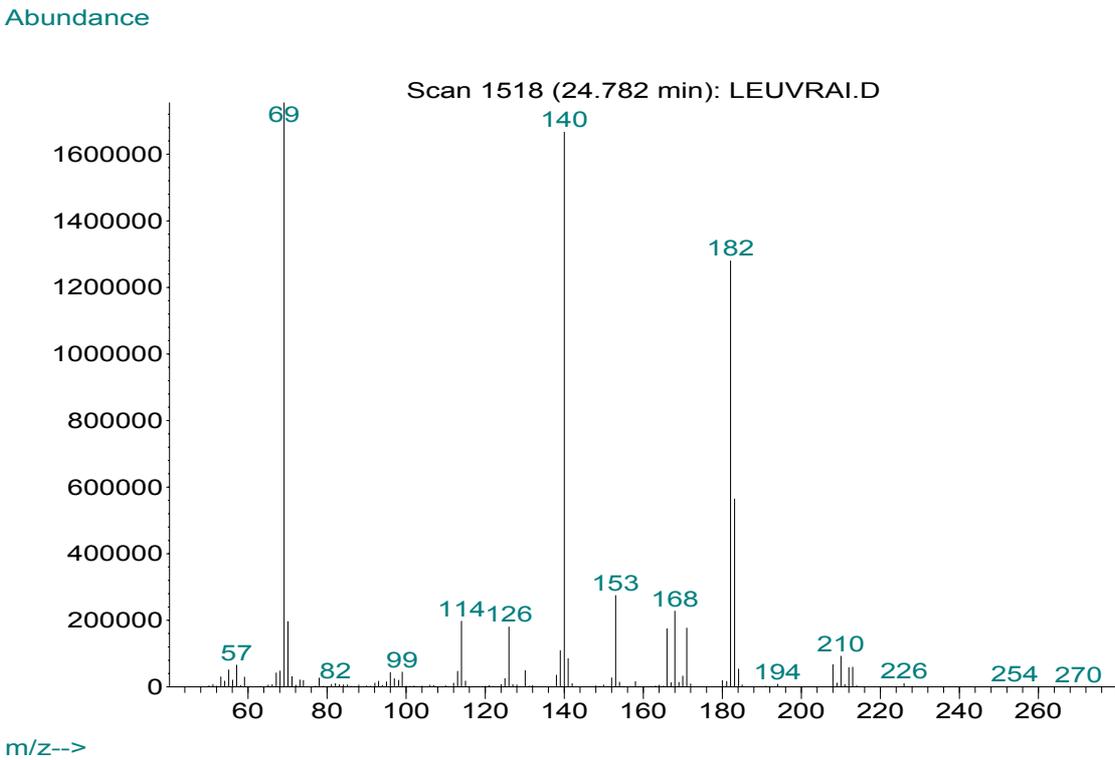


Fig. 38 : (a) Courant ionique total et (b) spectre CPG-IE-SM de la Leucine (L).

(a)



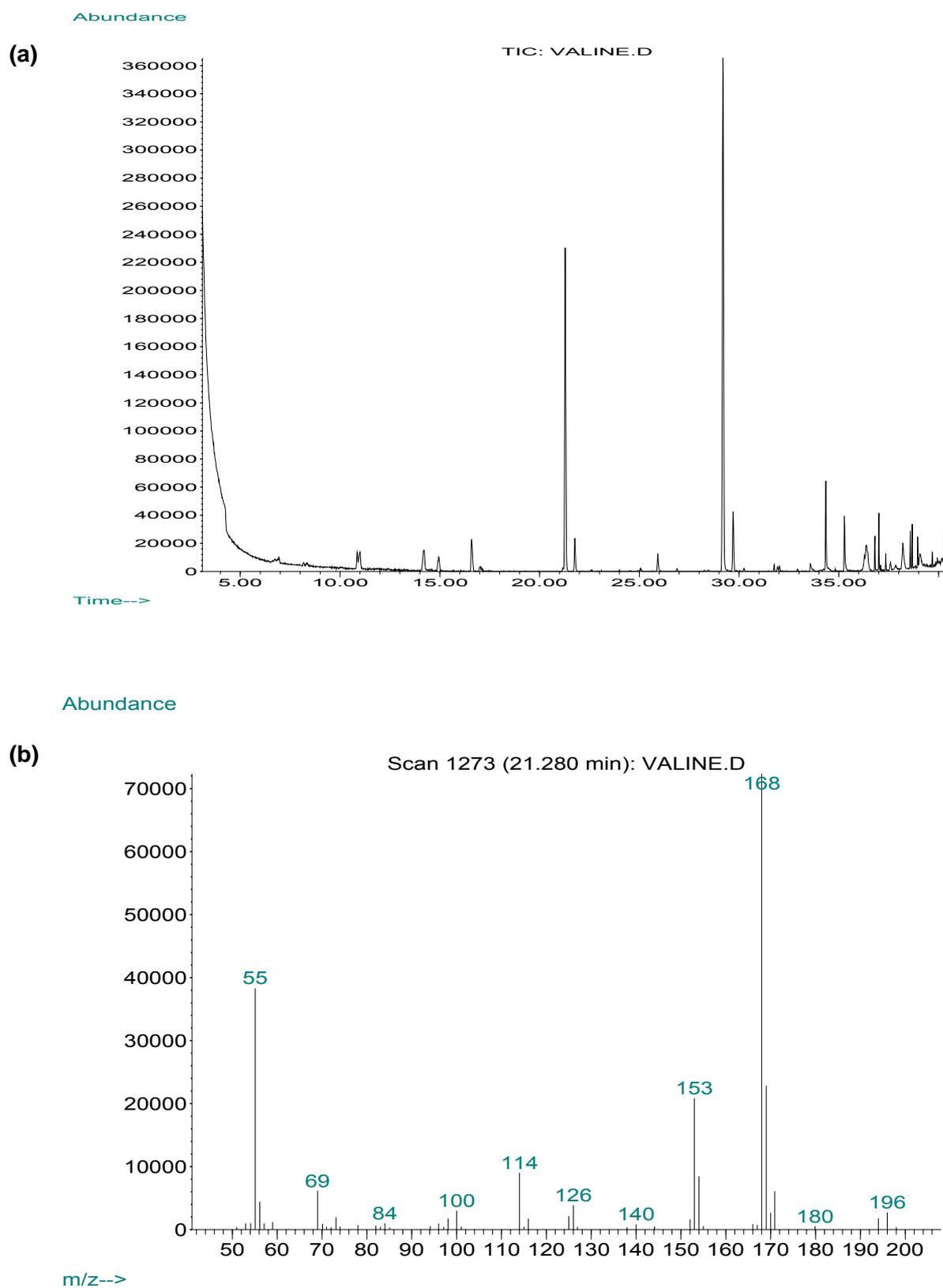


Fig. 40 : (a) Courant ionique total et (b) spectre CPG-IE-SM de la Valine (V).

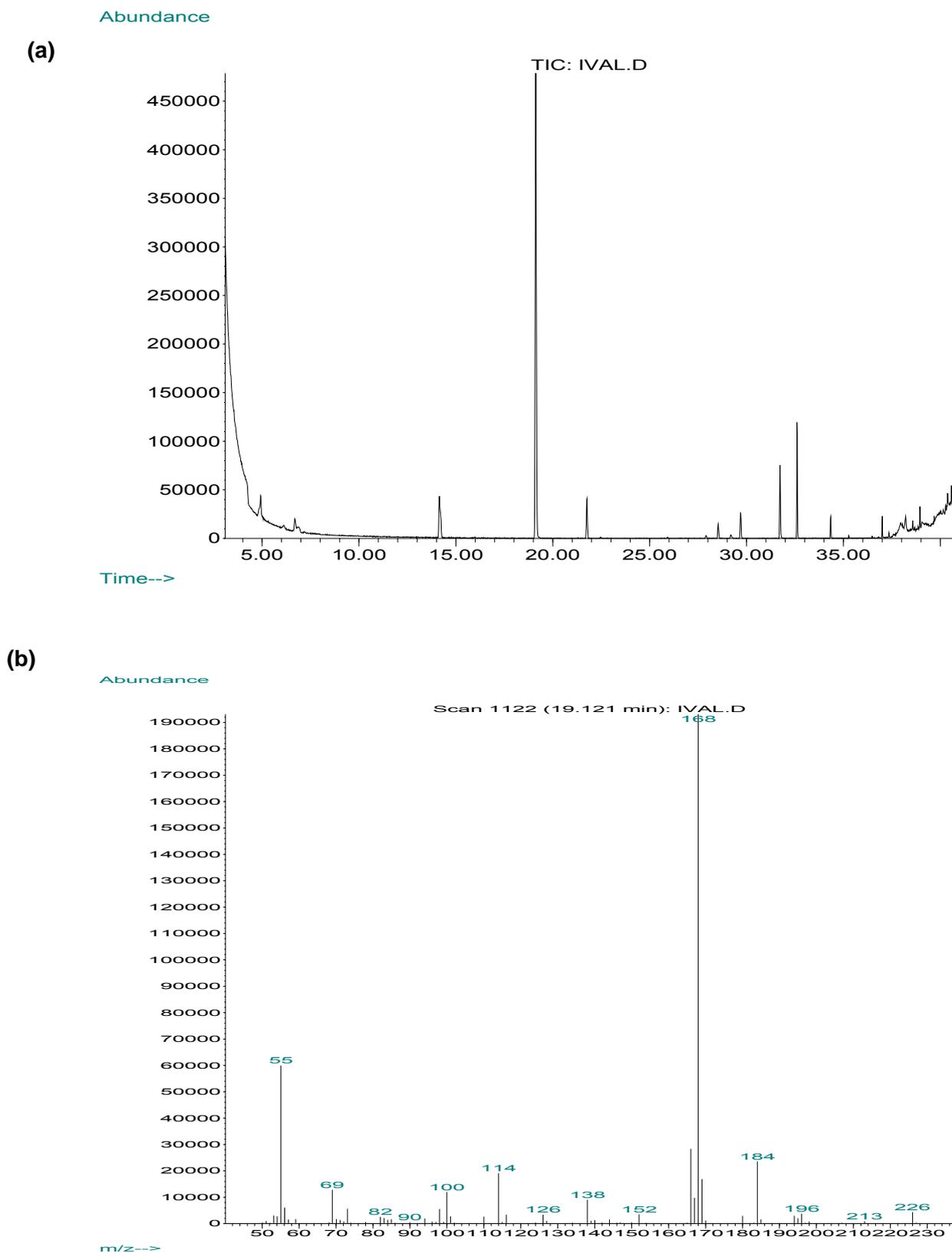


Fig. 41 : (a) Courant ionique total et (b) spectre CPG-IE-SM de l'Isovaline (J).

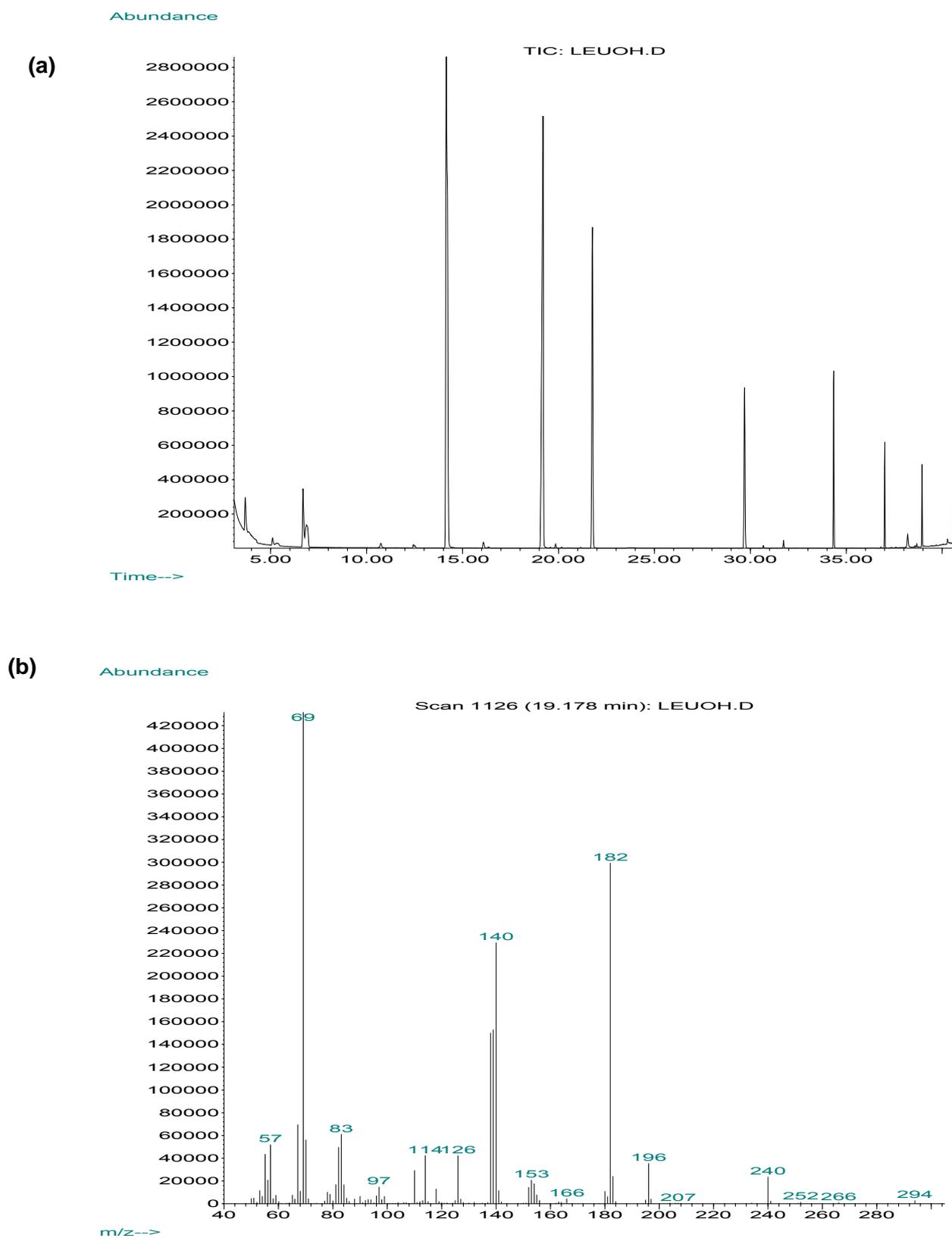


Fig. 42 : (a) Courant ionique total et (b) spectre CPG-IE-SM du Leucinol (LOH).

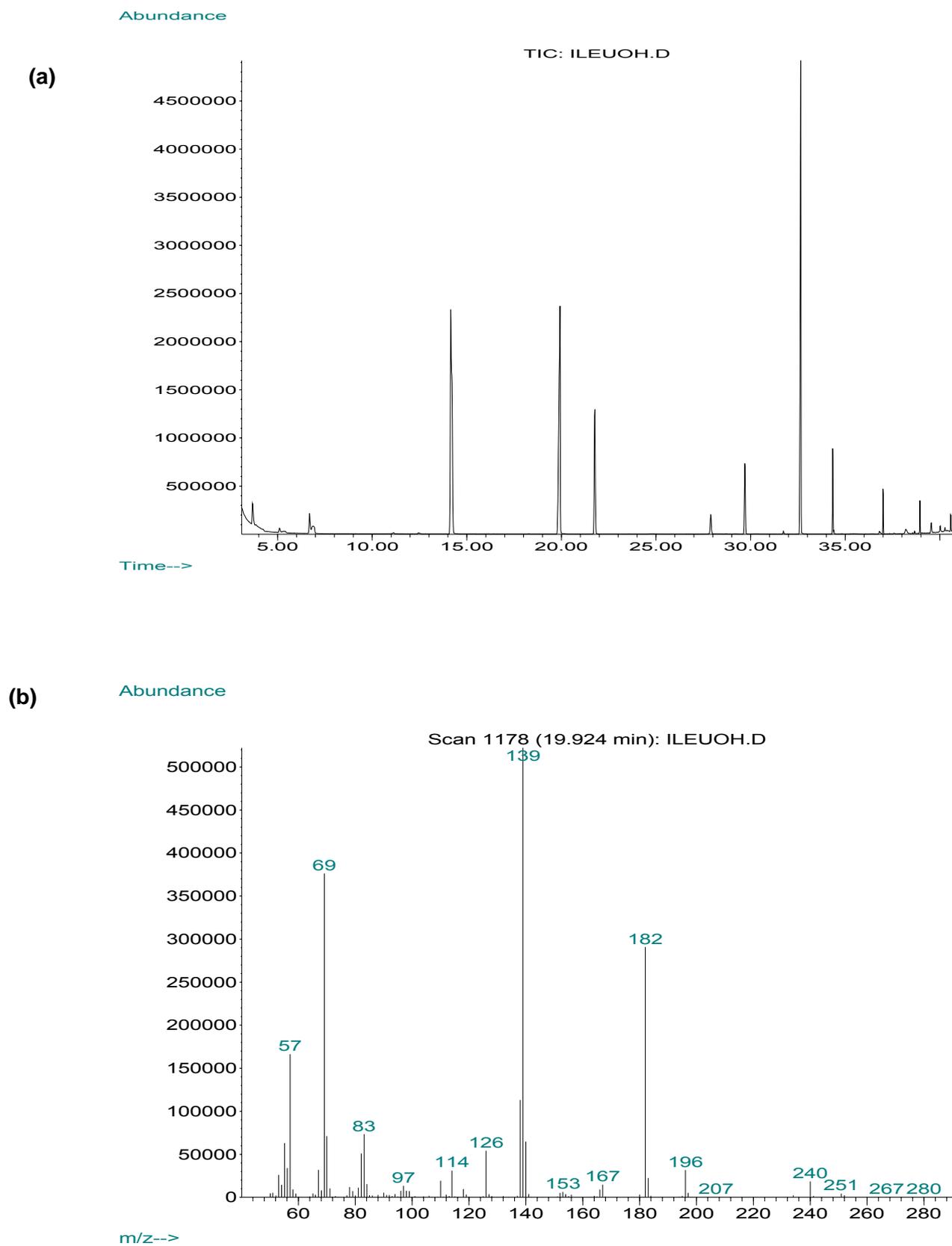
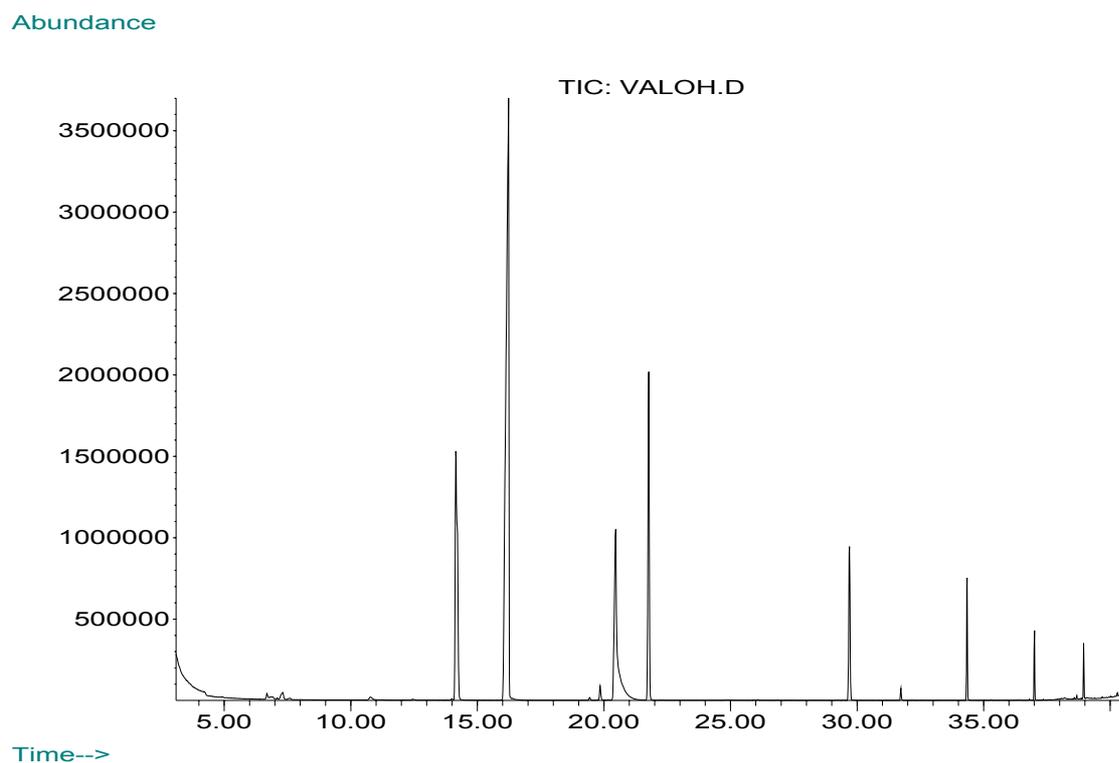


Fig. 43 : (a) Courant ionique total et (b) spectre CPG-IE-SM de l'Isoleucinol (IOH).

(a)



(b)

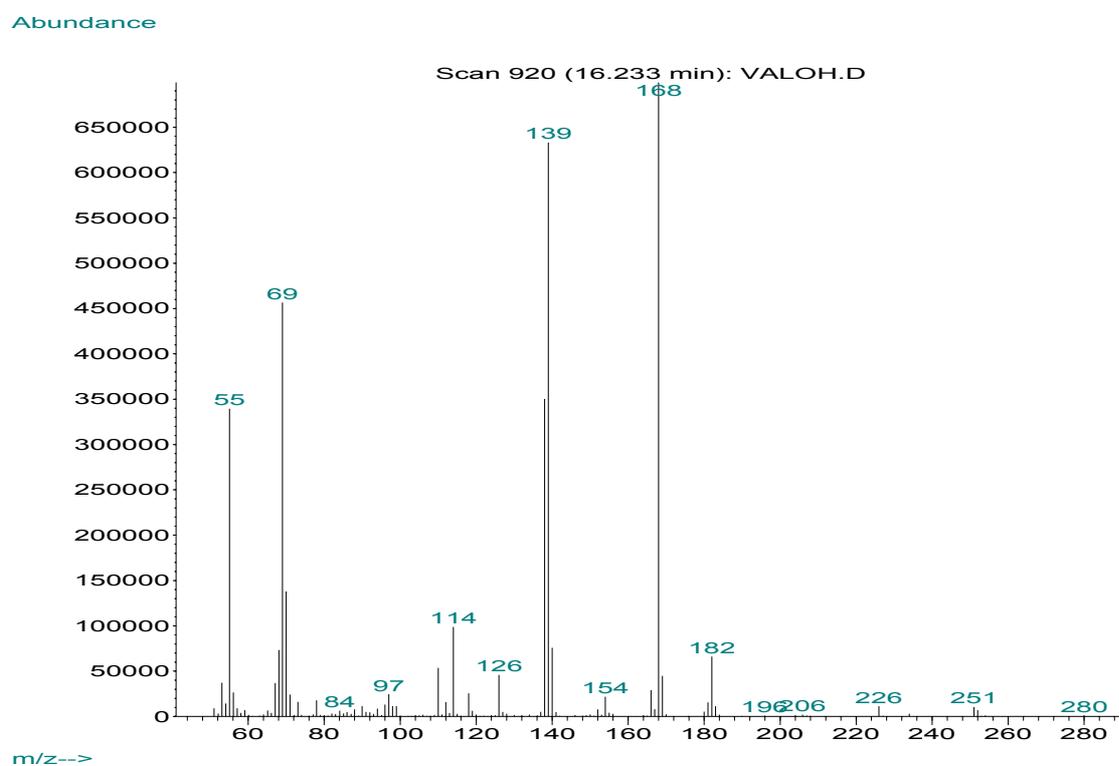


Fig. 44 : (a) Courant ionique total et (b) spectre CPG-IE-SM du Valinol (VOH).

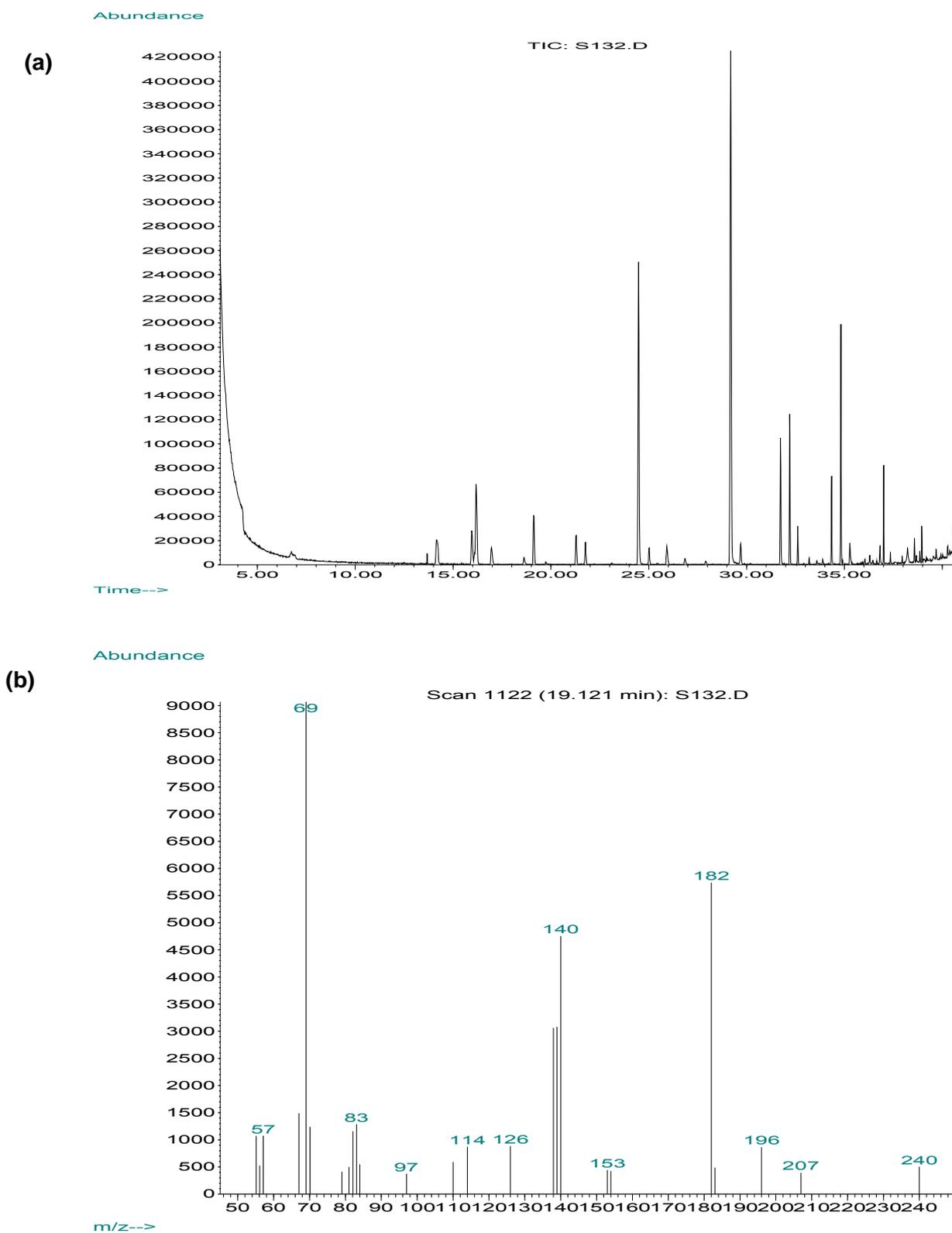


Fig. 45 : (a) Courant ionique total et (b) spectre CPG-IE-SM de l'isovaline (J) dans les peptaïbols la fraction CLHP 3 de la souche MMS 147.

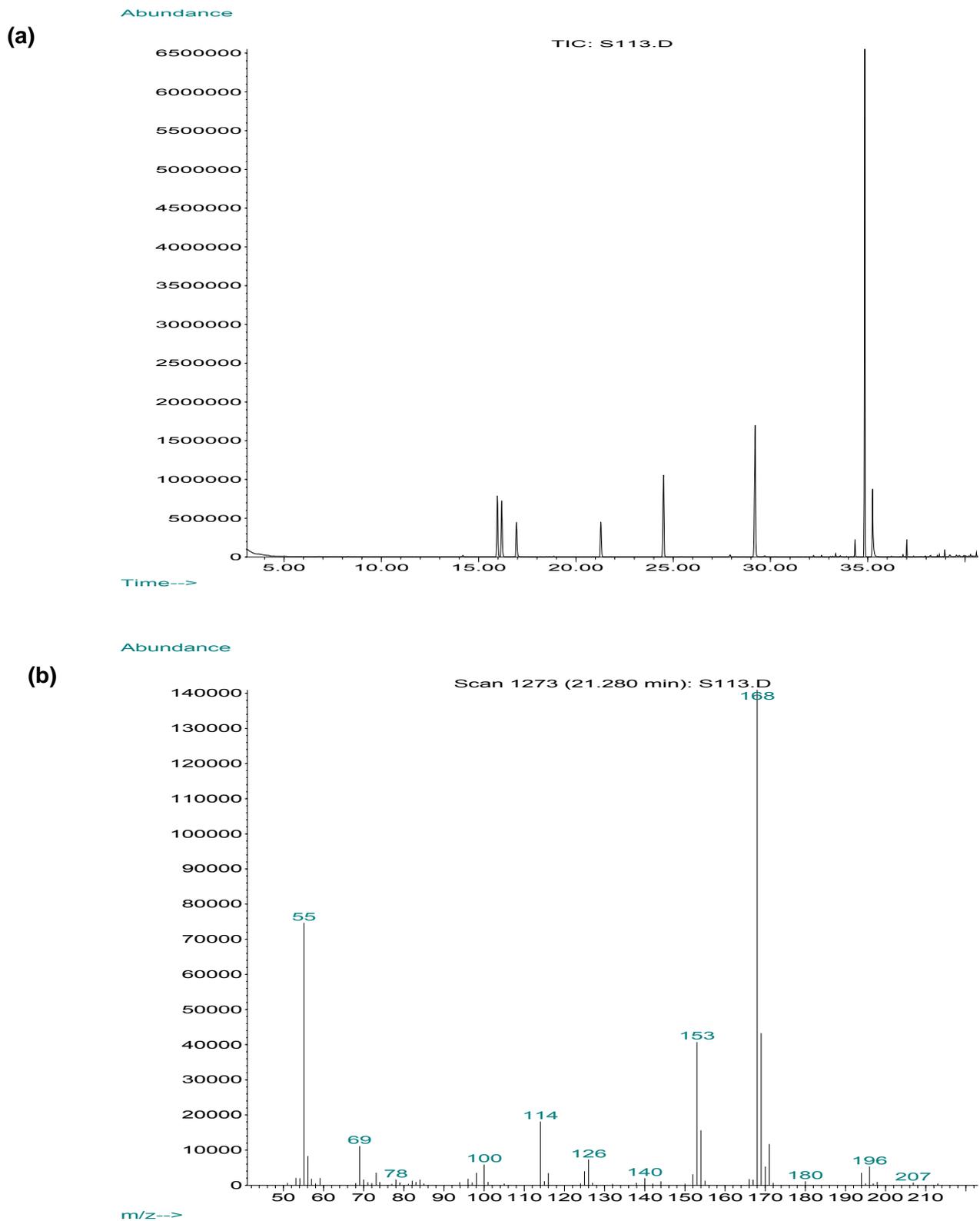


Fig. 46 : (a) Courant ionique total et (b) spectre CPG-IE-SM de la Valine (V) dans les peptaïbols la fraction CLHP 3 de la souche MMS 147.

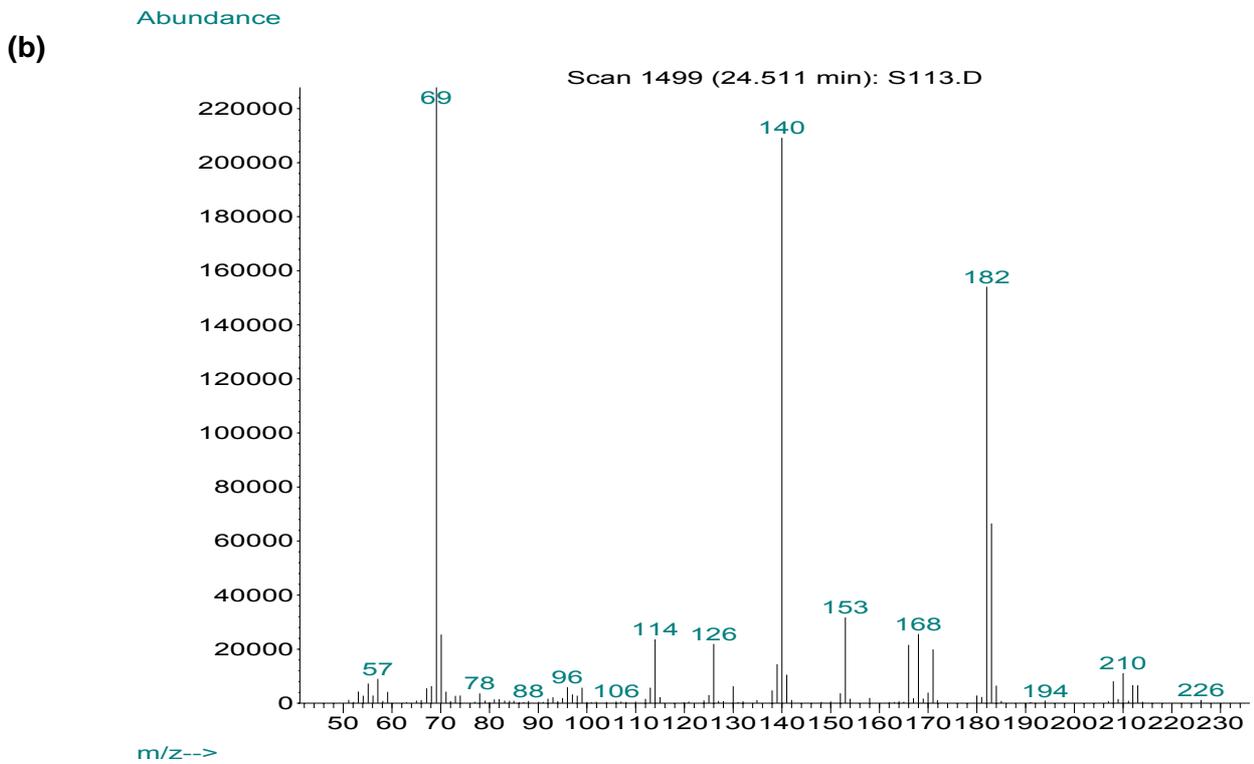
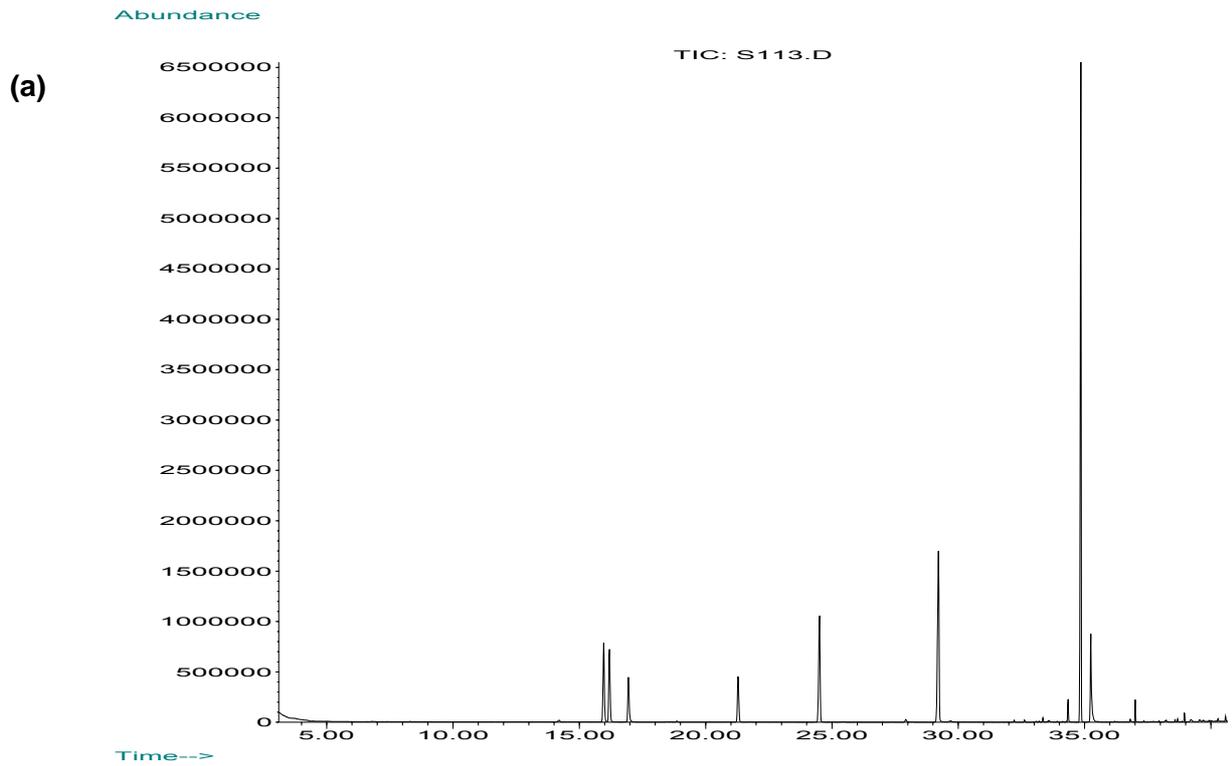


Fig. 47 : (a) Courant ionique total et (b) spectre CPG-IE-SM de la Leucine (L) dans les peptaïbols la fraction CLHP 3 de la souche MMS 147.

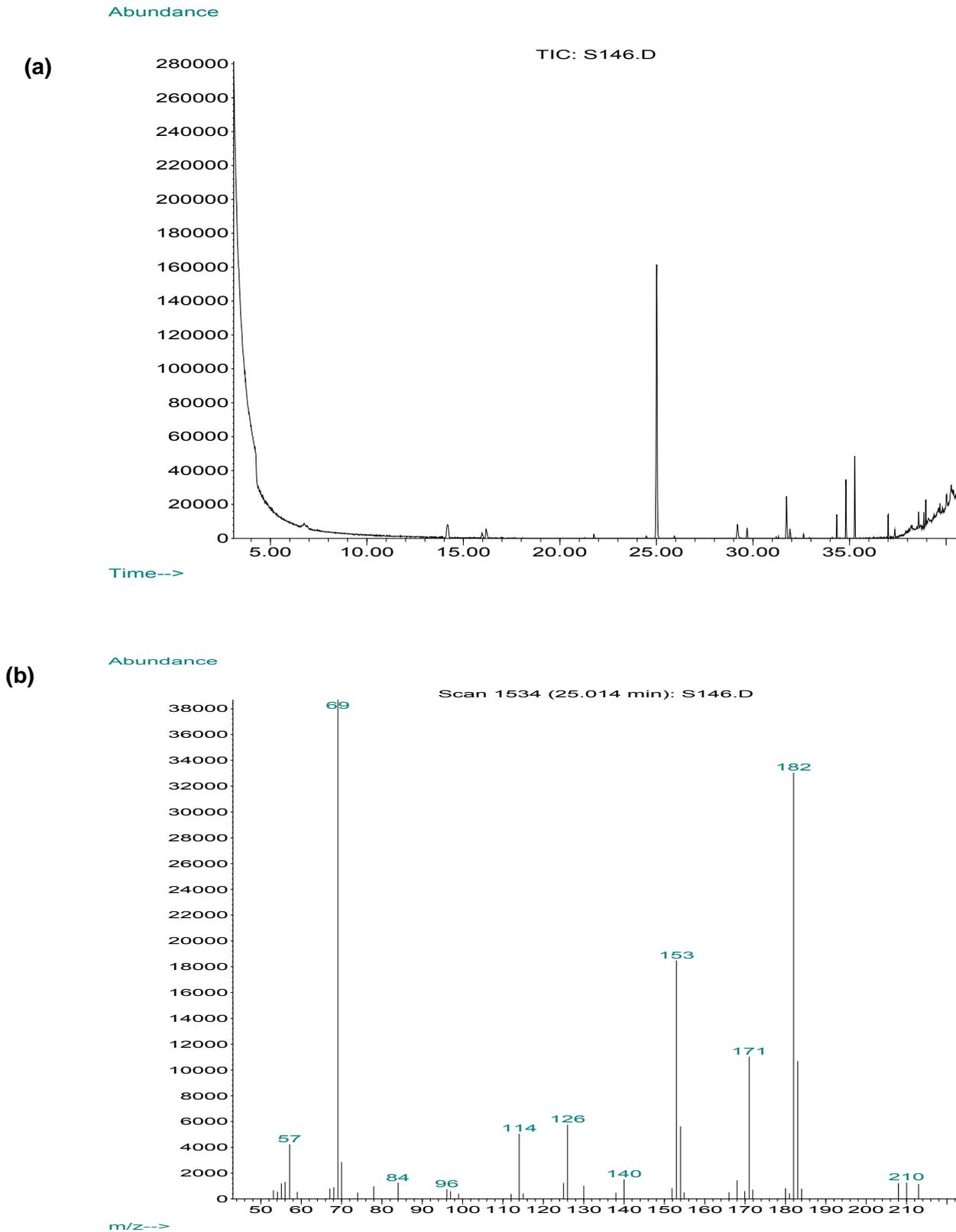


Fig. 48 : (a) Courant ionique total et (b) spectre CPG-IE-SM de l'isoleucine (I) dans les peptaïbols la fraction CLHP 3 de la souche MMS 147.

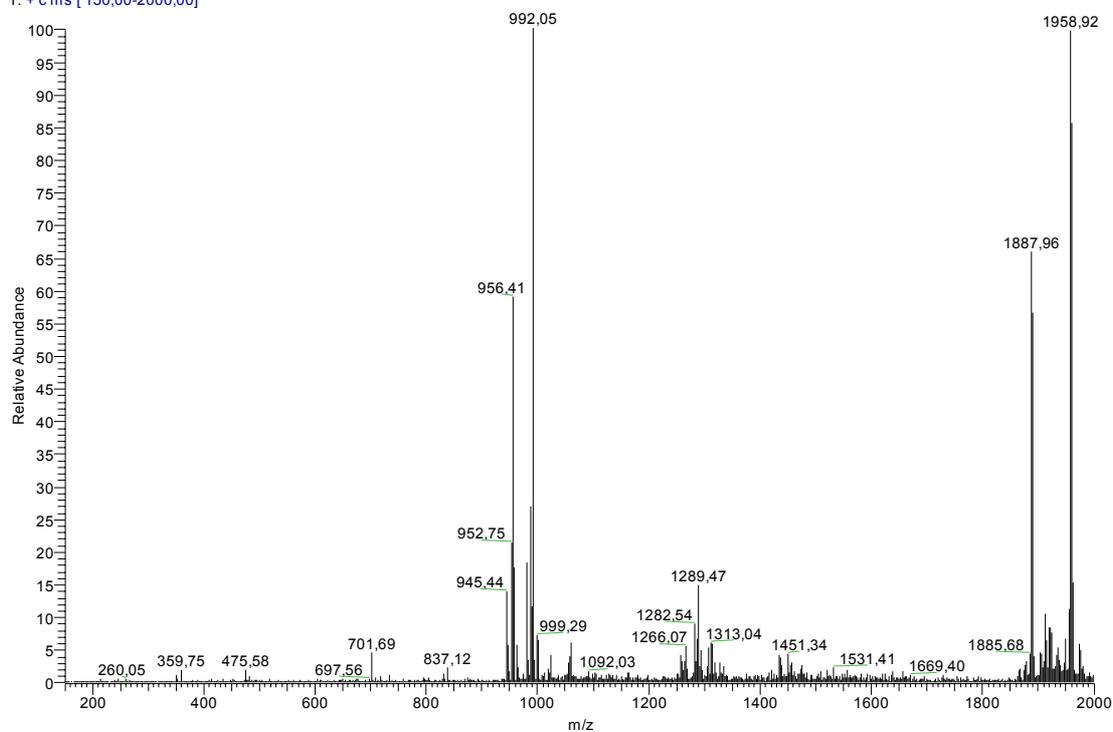
Annexe 2 : Fichier PPT non accessible sur cette version en ligne

Annexe 3

Spectres ESI-SMⁿ des peptaïbols déjà connus

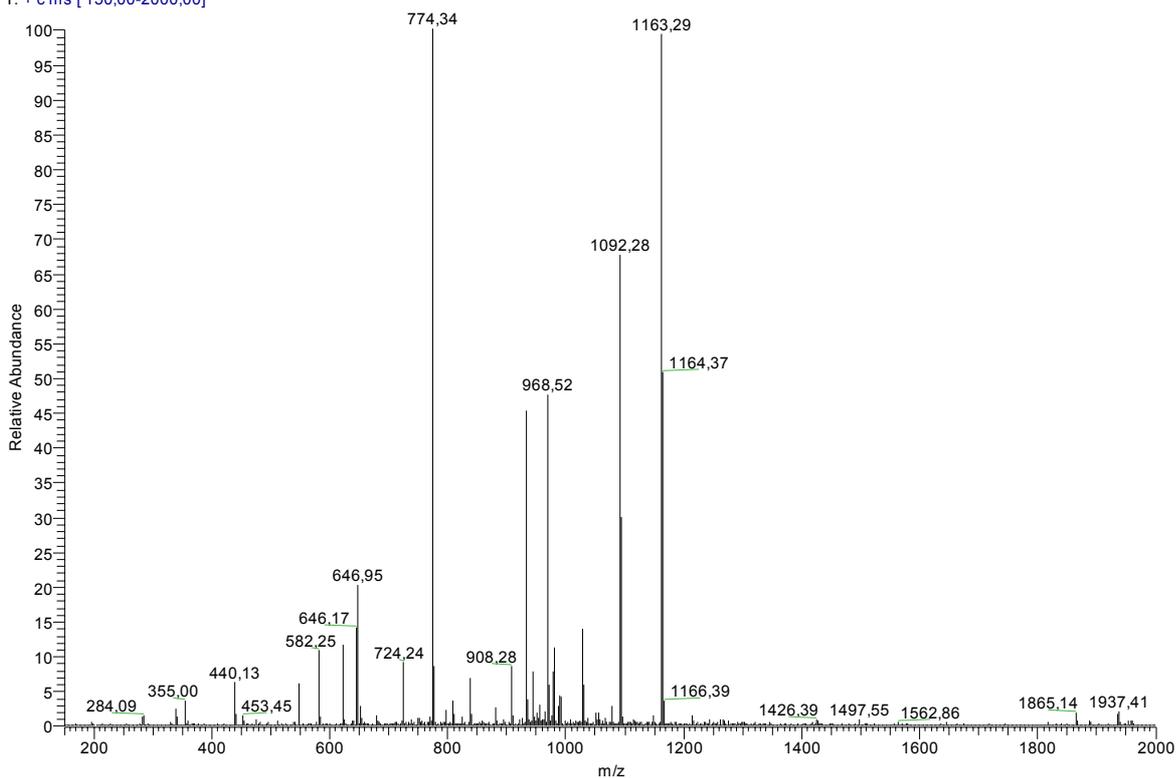
Spectres ESI-SM des peptaïbols déjà connus produits par *Trichoderma* MMS 147**Fraction HPLC 3 peptides 4 et 5**
Sans TFA, Full scan

Souche11HPLCopt3ssTFFull#58-62 RT: 1,71-1,83 AV: 5 NL: 4,39E7
T: + c ms [150,00-2000,00]



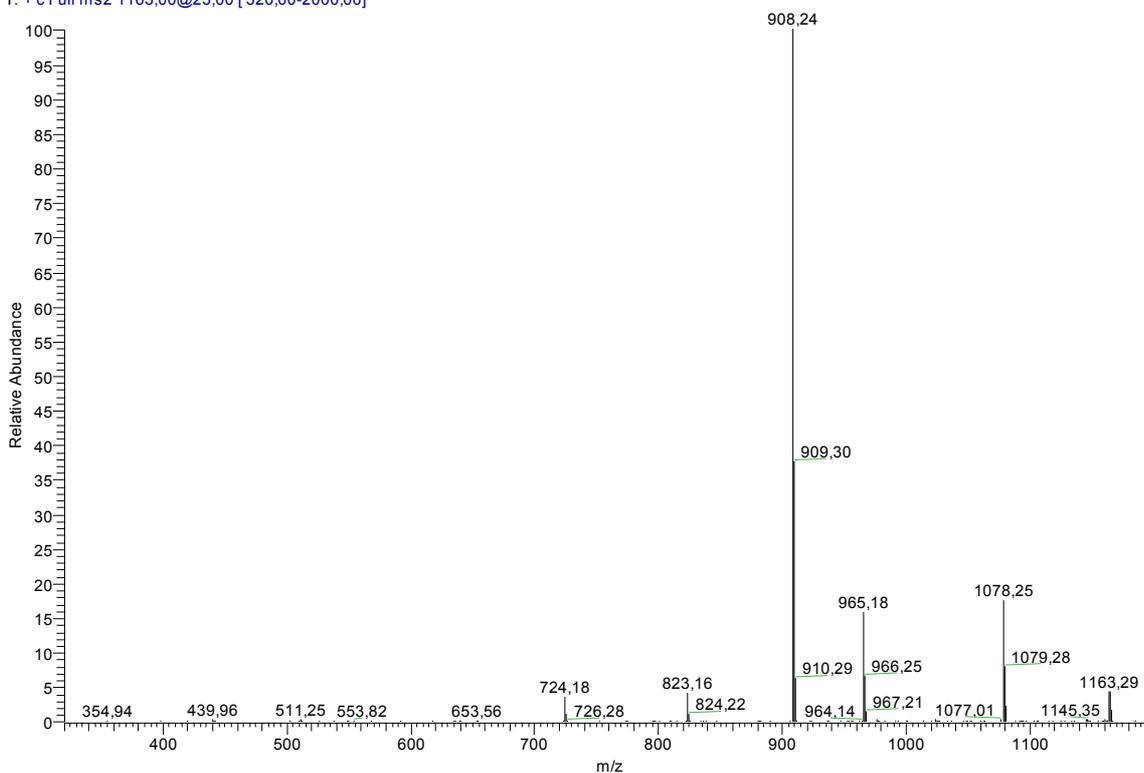
Après addition de TFA, Full scan

S11-10%HPLC3opt+TFFull #25 RT: 0,72 AV: 1 NL: 4,23E7
T: + c ms [150,00-2000,00]



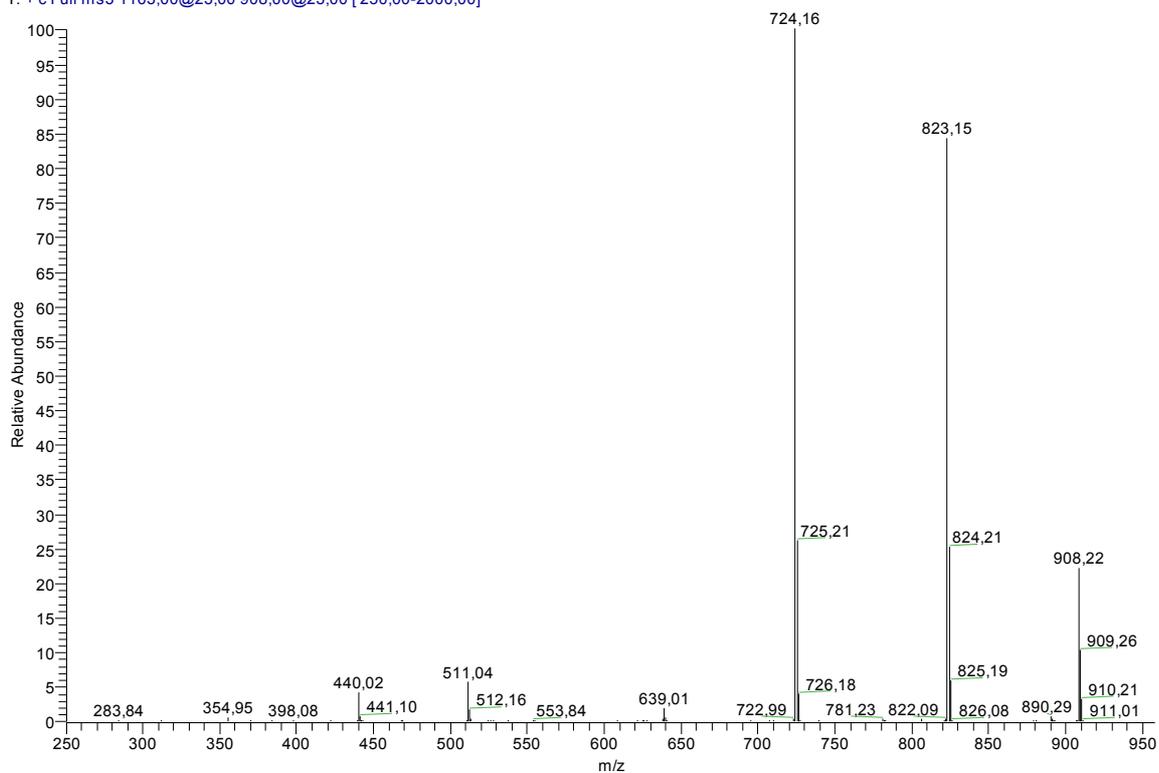
MS² de l'ion 1163

S11-10%HPLC3opt+TFAMS2-1163 #3-8 RT: 0,07-0,19 AV: 6 NL: 2,43E7
T: + c Full ms2 1163,00@23,00 [320,00-2000,00]

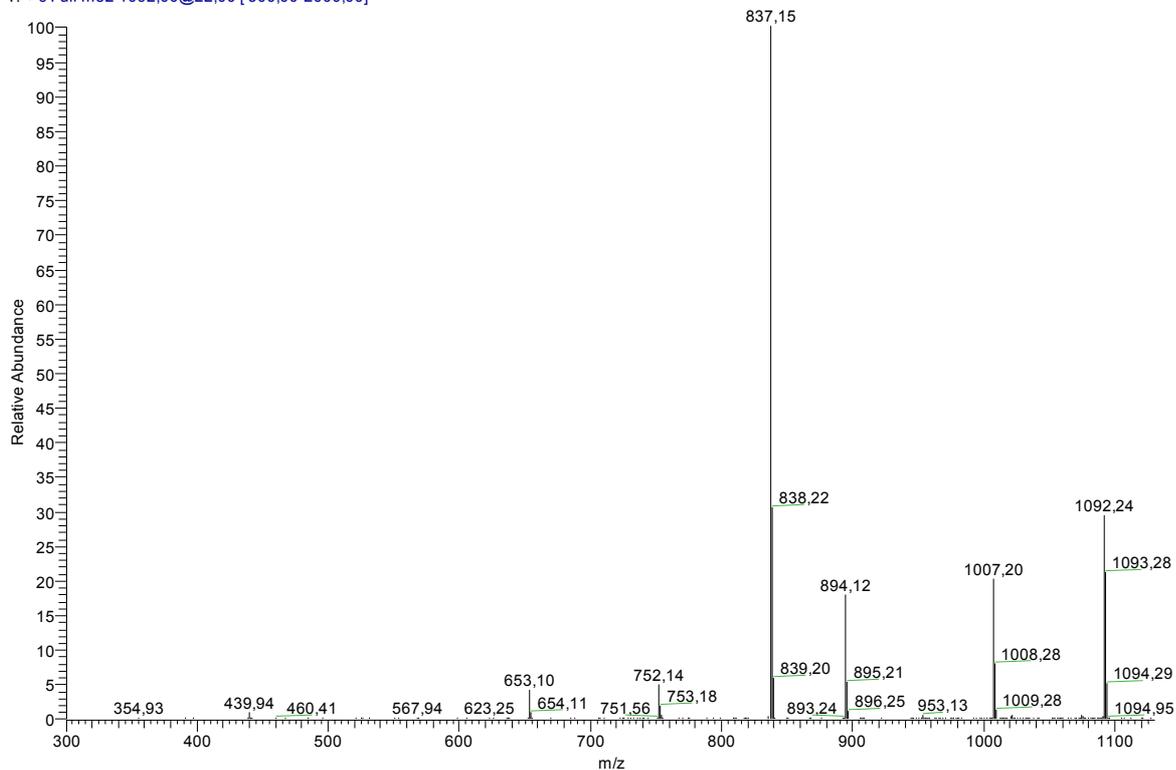


MS³ de l'ion 908

S11-10%HPLC3opt+TFAMS3-908 #4-11 RT: 0,11-0,31 AV: 8 NL: 1,75E7
T: + c Full ms3 1163,00@23,00 908,00@23,00 [250,00-2000,00]

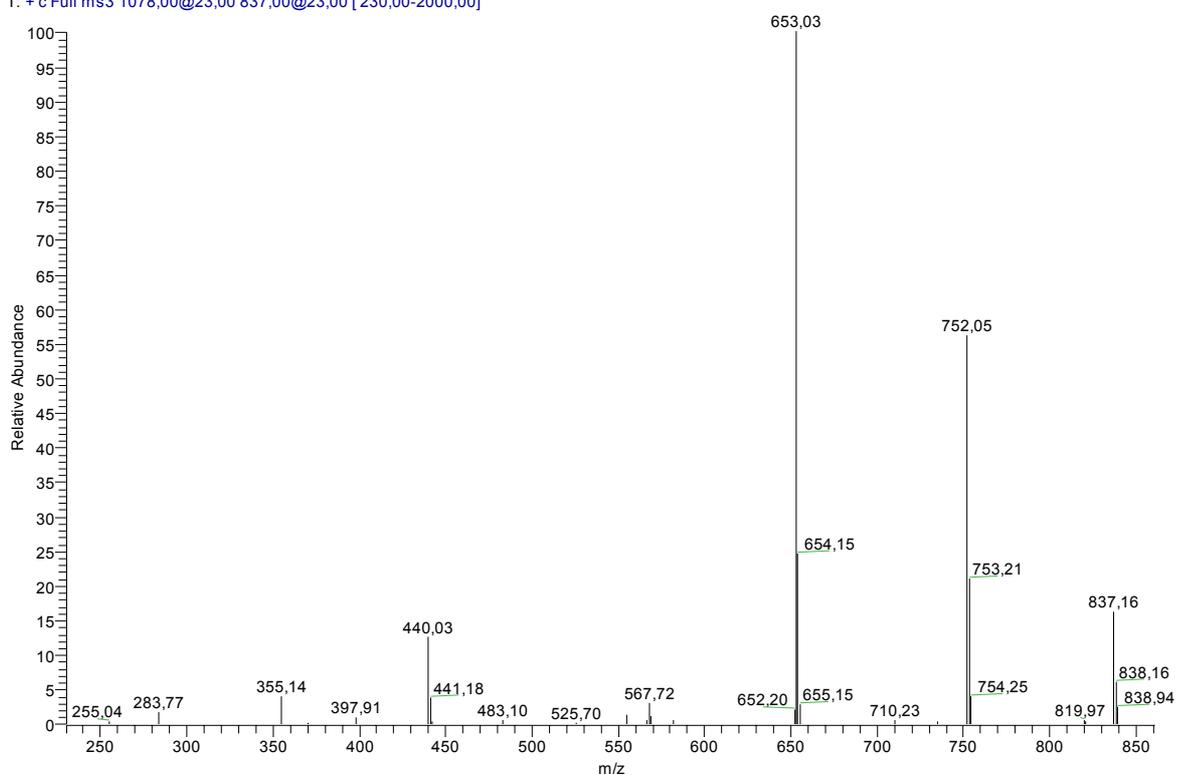
MS² de l'ion 1092

Souche11HPLCopt3+TFASM1092 #14-21 RT: 0,34-0,53 AV: 8 NL: 1,01E7
T: + c Full ms2 1092,00@22,00 [300,00-2000,00]

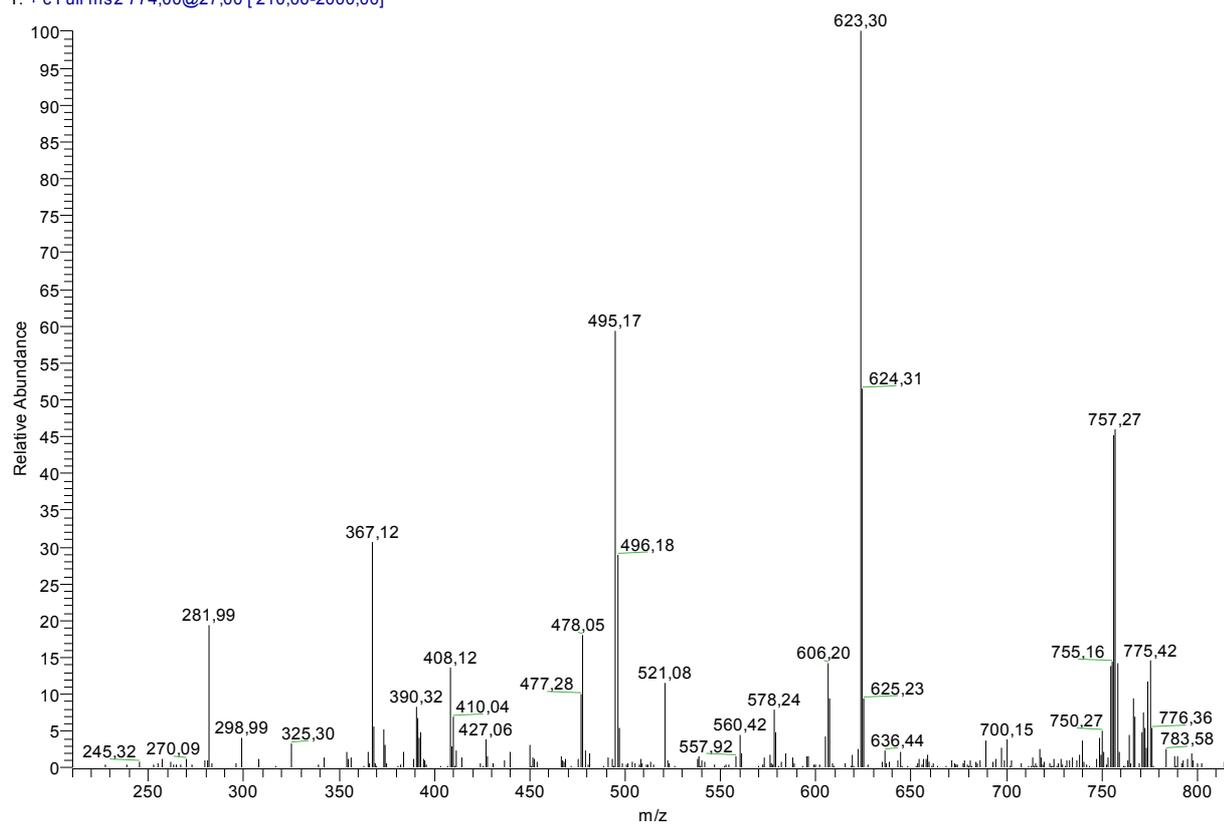


MS³ de l'ion 837

S11-10%HPLC2opt+TFAMS3-837 #5-6 RT: 0,14-0,17 AV: 2 NL: 2,90E5
T: + c Full ms3 1078,00@23,00 837,00@23,00 [230,00-2000,00]

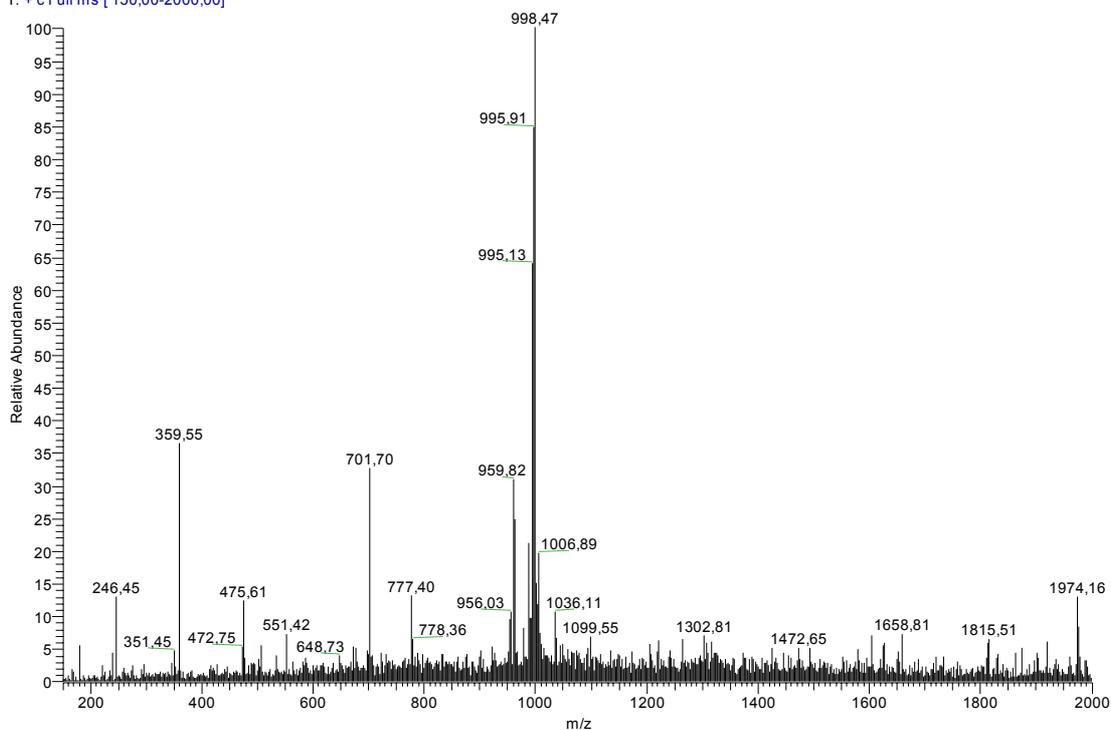
MS² de l'ion 774

S11-10%HPLC4opt+TFAMS2-774 #6-18 RT: 0,16-0,50 AV: 13 NL: 1,16E5
T: + c Full ms2 774,00@27,00 [210,00-2000,00]



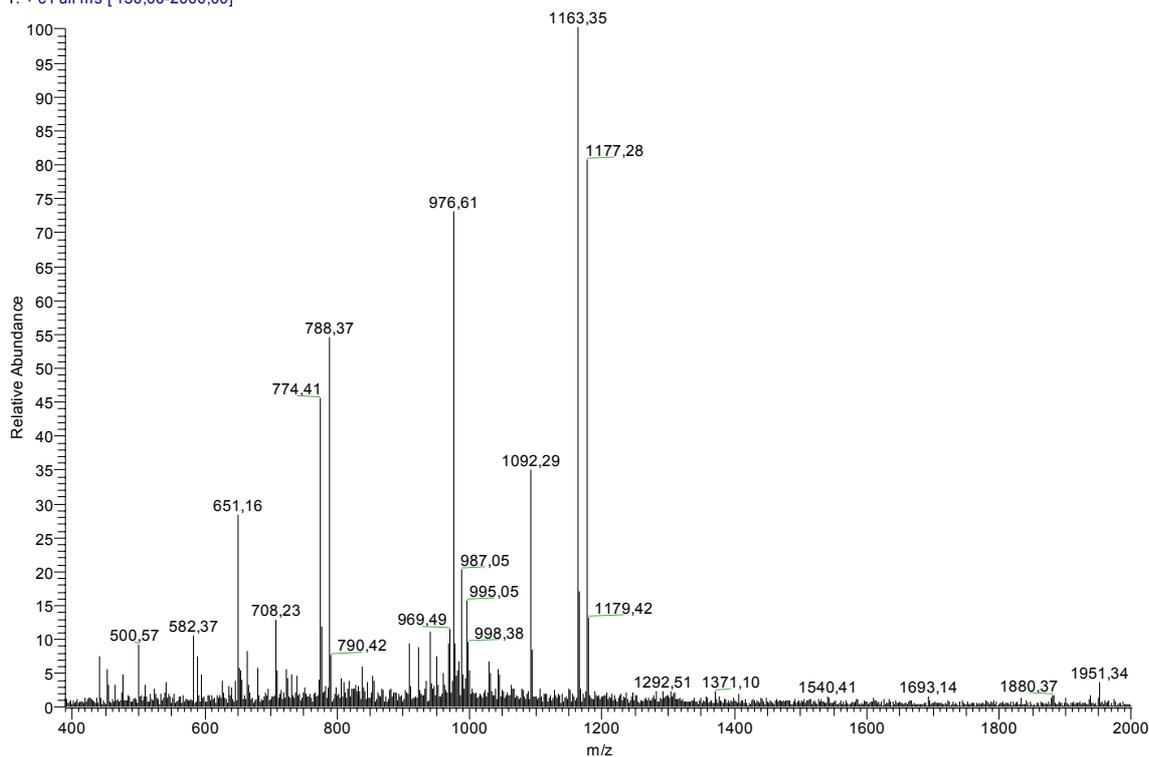
Spectres ESI-SM des peptaïbols déjà connus produits par *Trichoderma* MMS 147**Fraction HPLC 4 peptides 6 et 7**
Sans TFA, Full scan

S11-10%HPLC4optssTFAMFull #40 RT: 1,20 AV: 1 NL: 3,17E6
T: + c Full ms [150,00-2000,00]



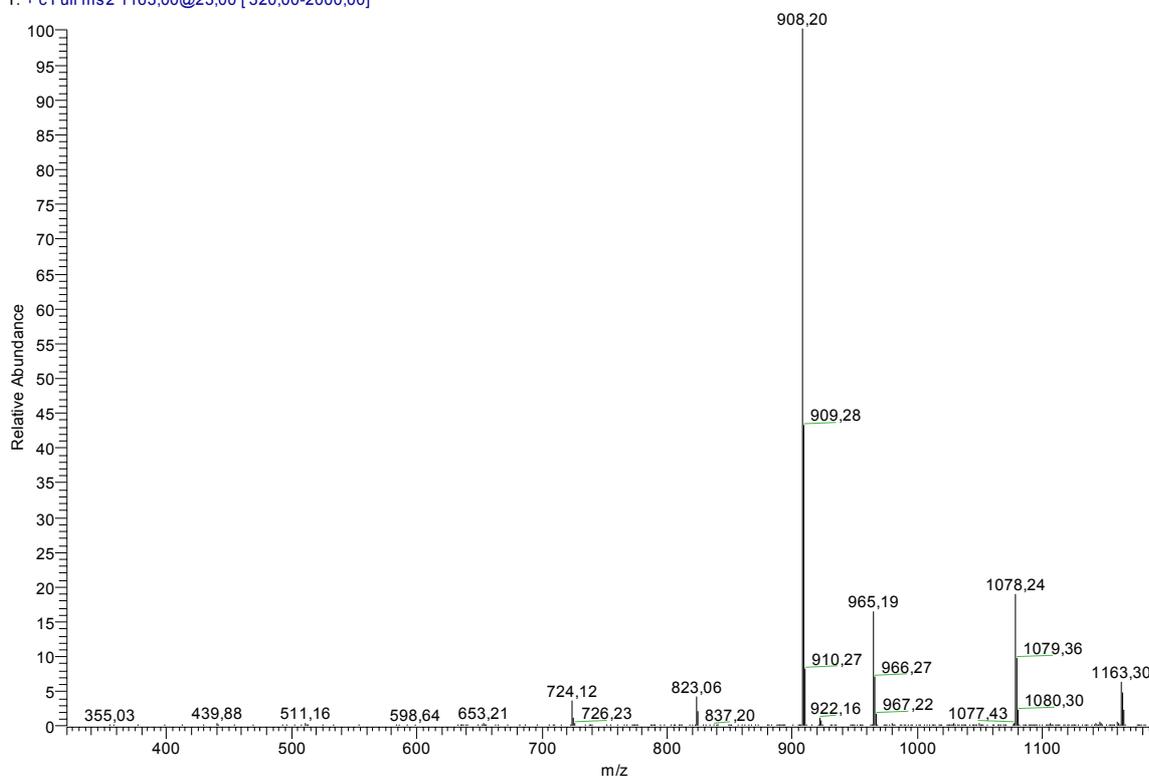
Après addition de TFA, Full scan

S11-10%HPLC4opt+TFAFull #22 RT: 0,65 AV: 1 NL: 5,08E6
T: + c Full ms [150,00-2000,00]



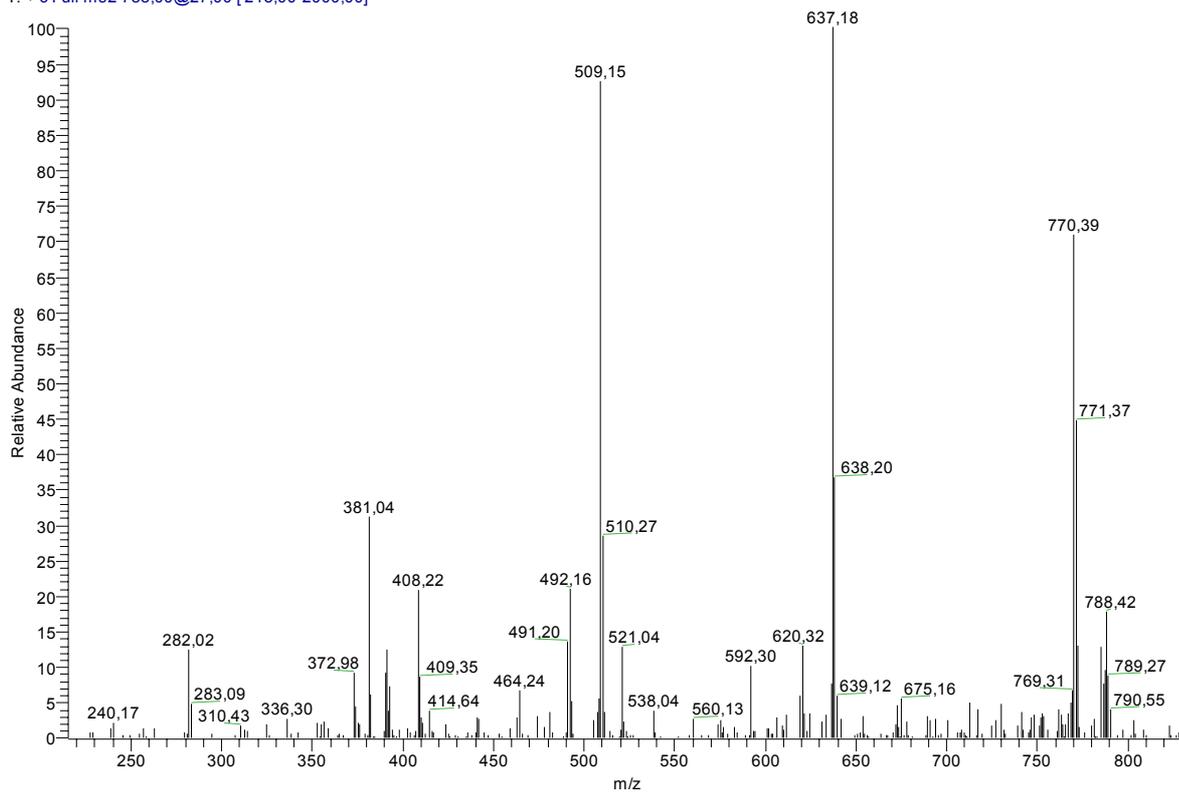
MS² de l'ion 1163

S11-10%HPLC4opt+TFAMS2-1163 #19-32 RT: 0,49-0,85 AV: 14 NL: 2,51E6
T: + c Full ms2 1163,00@23,00 [320,00-2000,00]



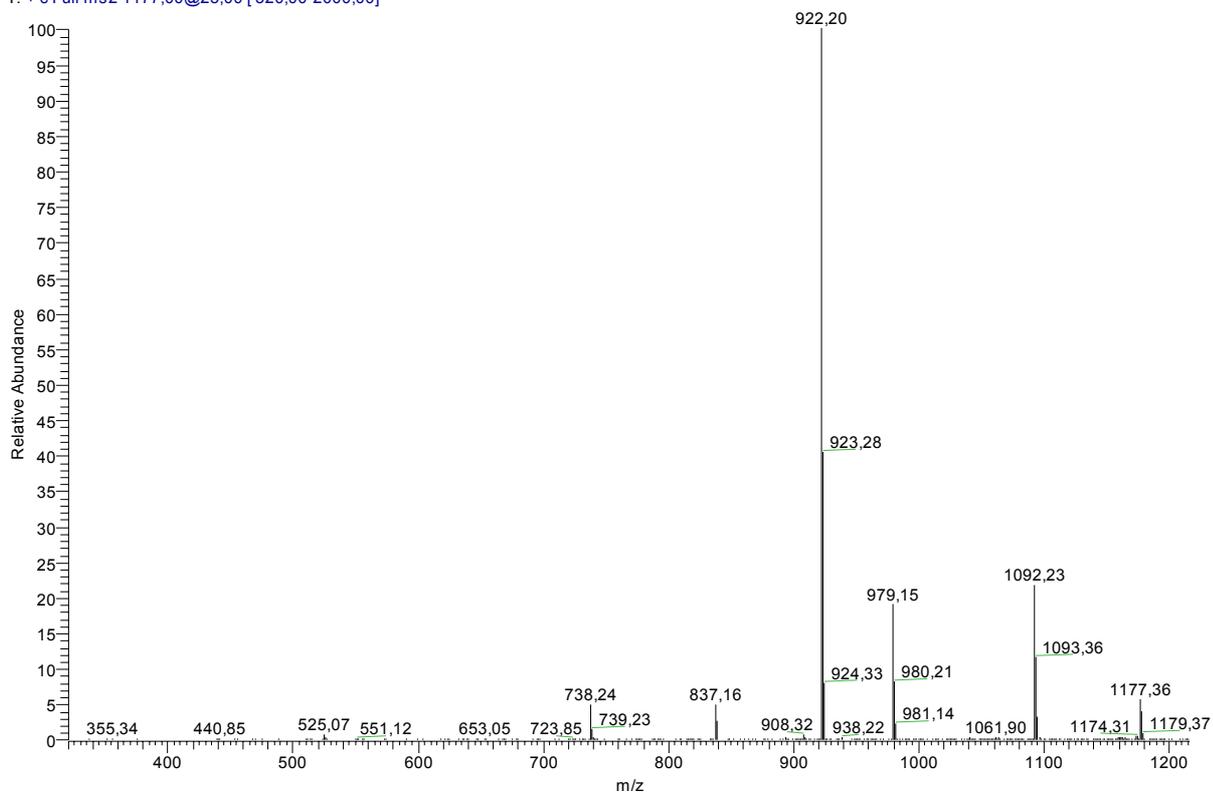
MS² de l'ion 788

S11-10%HPLC4opt+TFAMS2-788 #19-26 RT: 0,52-0,72 AV: 8 NL: 7,88E4
T: + c Full ms2 788,00@27,00 [215,00-2000,00]

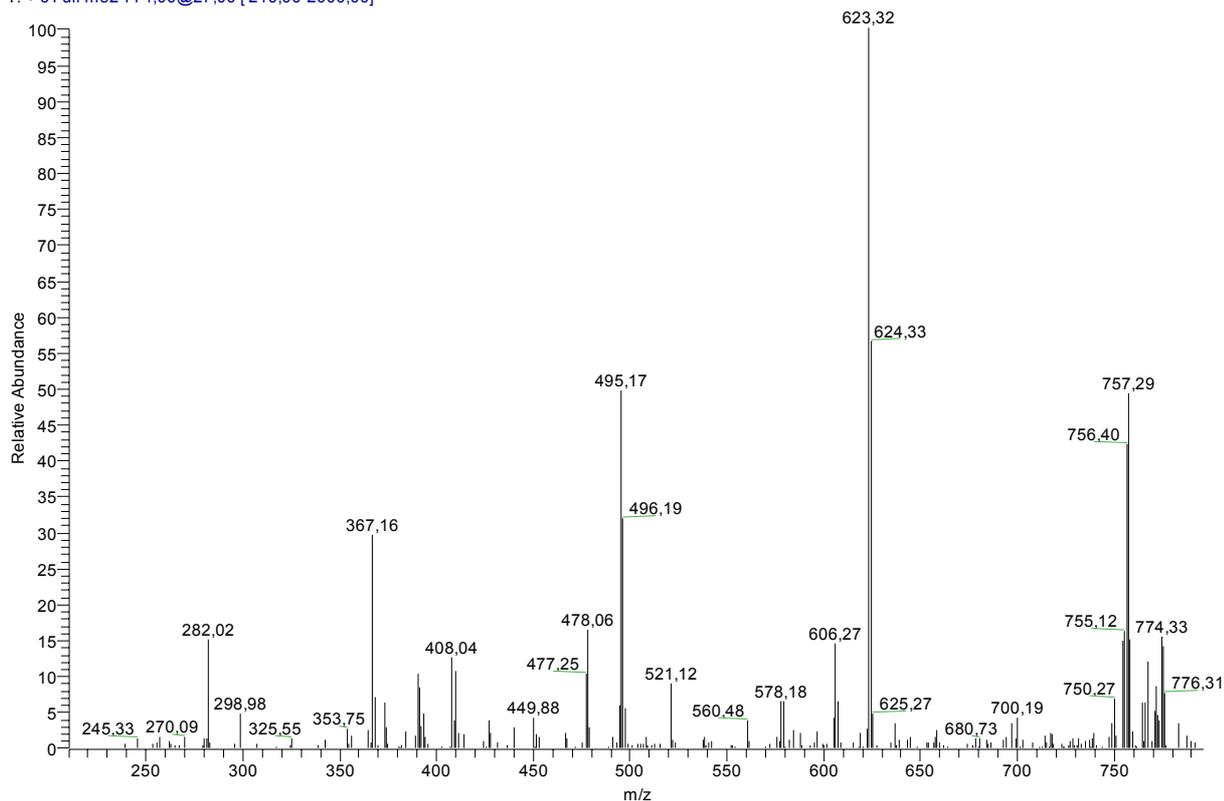


MS² de l'ion 1177

S11-10%HPLC4opt+TFAMS2-1177 #9-19 RT: 0,24-0,51 AV: 11 NL: 2,27E6
T: + c Full ms2 1177,00@23,00 [320,00-2000,00]

MS² de l'ion 774

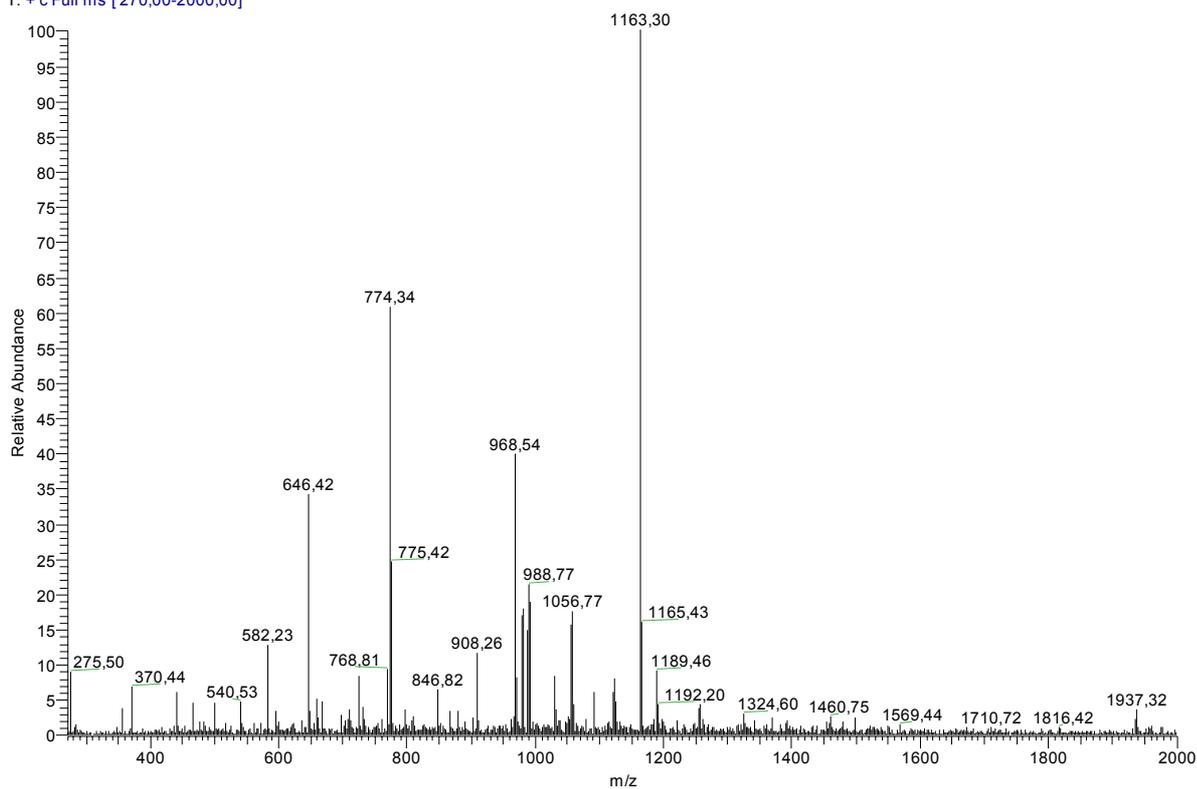
S11-10%HPLC4opt+TFAMS2-774 #8 RT: 0,21 AV: 1 NL: 1,15E5
T: + c Full ms2 774,00@27,00 [210,00-2000,00]



Spectres ESI-SM des peptaïbols déjà connus produits par *Trichoderma* MMS 151

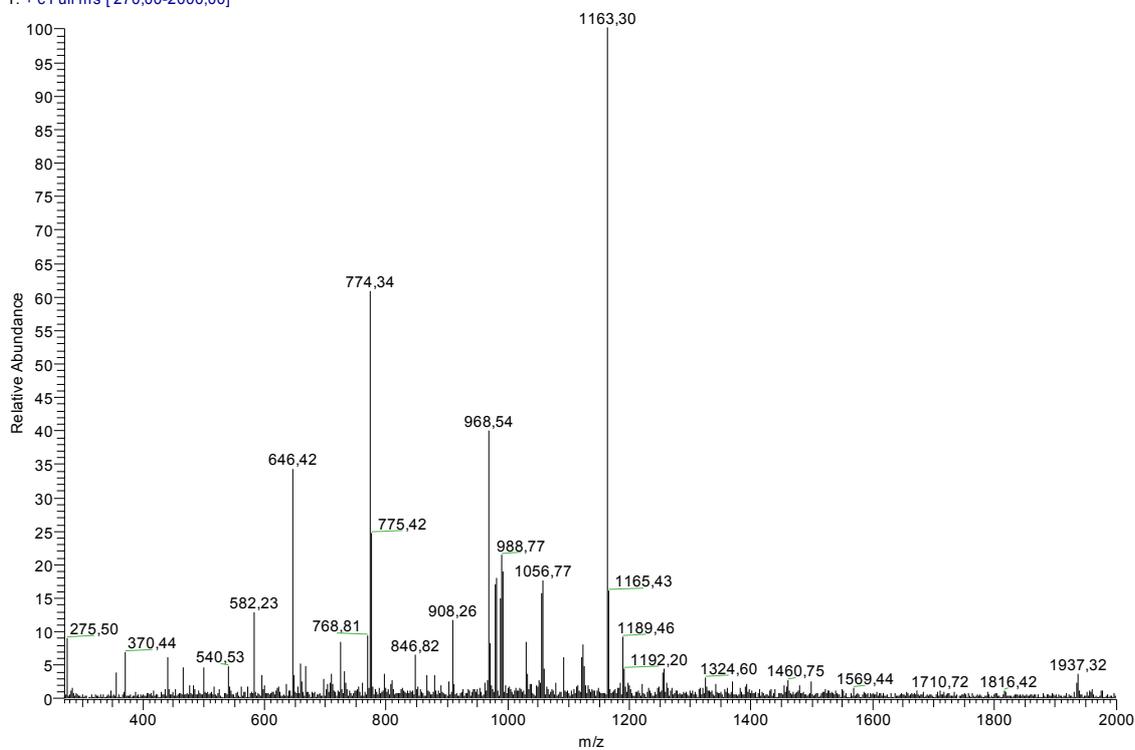
Fraction HPLC 5 peptides 5 (idem que peptide 1 HPLC 1 MMS 175 et peptide 4 HPLC 4 MMS 204)
Sans TFA, Full scan

S13-10%HPLC5opt+TFAFull #3-16 RT: 0,06-0,45 AV: 14 NL: 6,05E5
T: + c Full ms [270,00-2000,00]



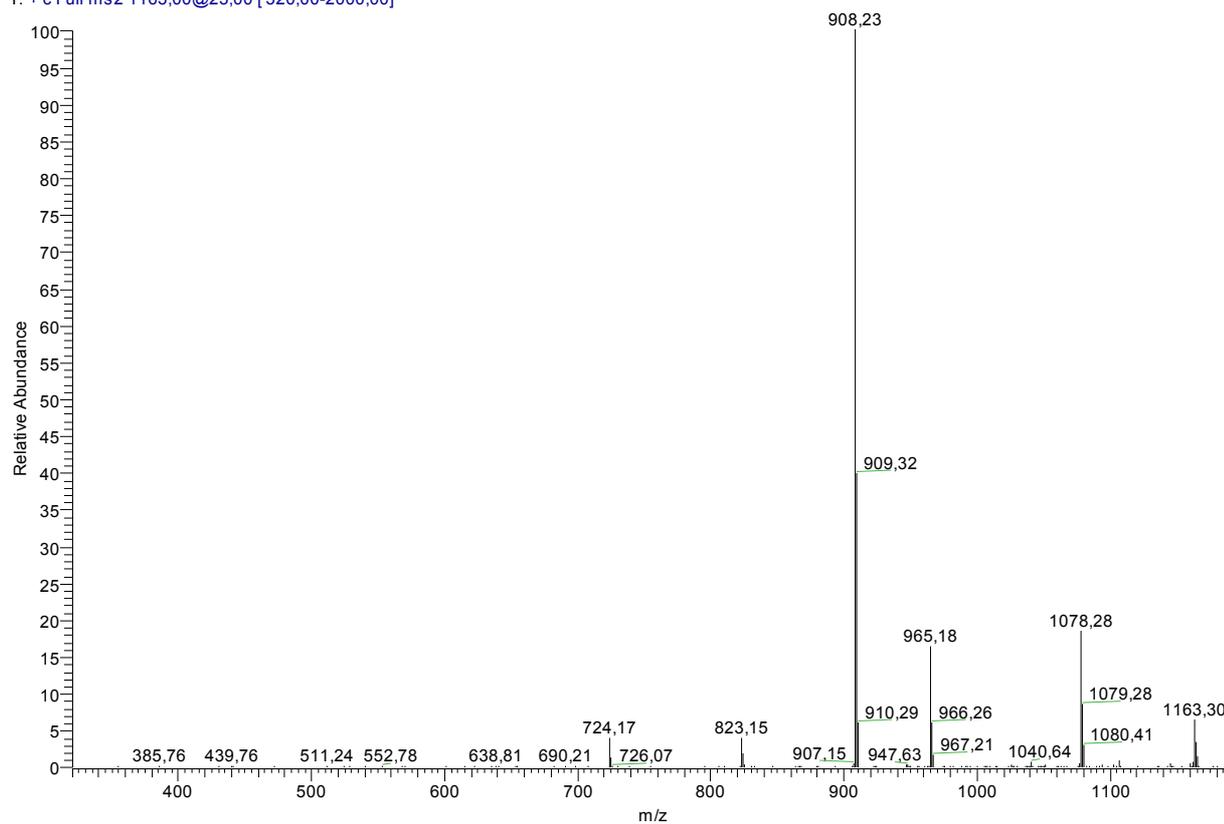
Après addition de TFA, Full scan

S13-10%HPLC5opt+TFAFull #3-16 RT: 0,06-0,45 AV: 14 NL: 6,05E5
T: + c Full ms [270,00-2000,00]



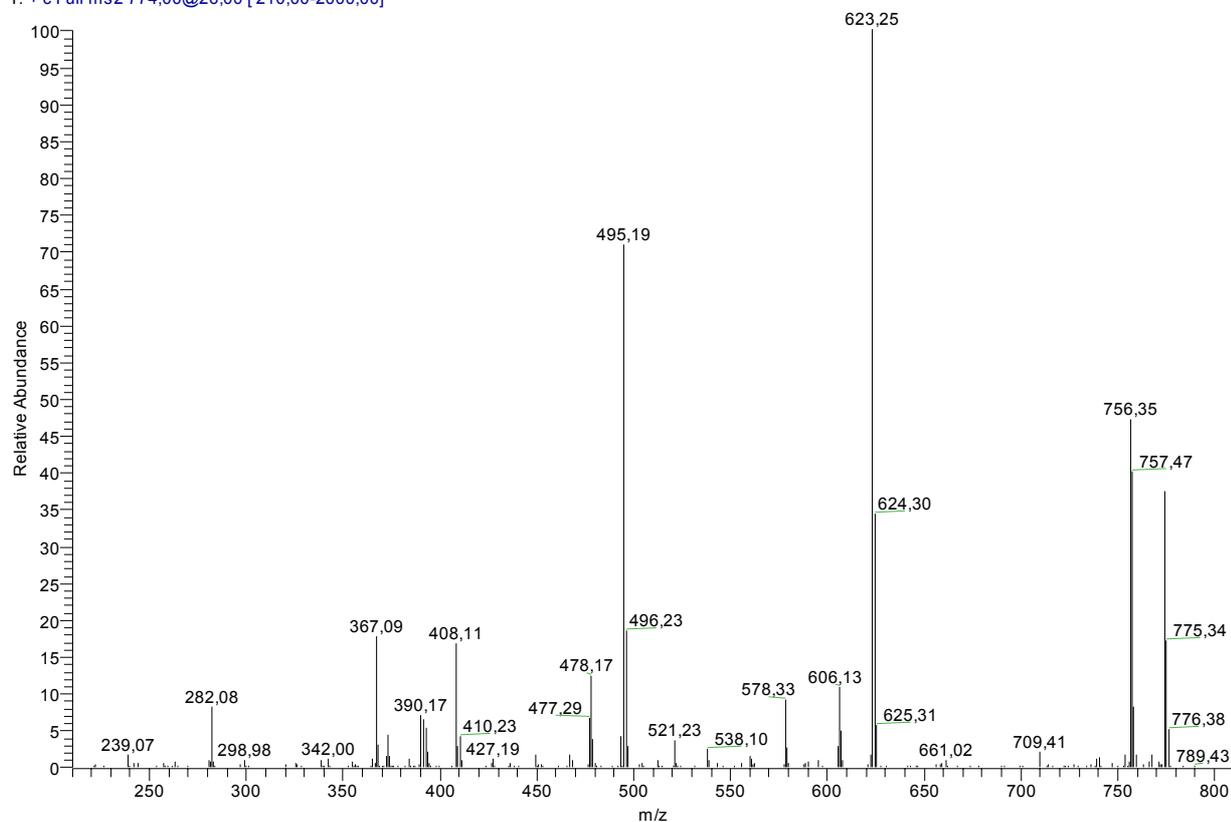
MS² de l'ion 1163

S13-10%HPLC5opt+TFAMS2-1163 #15-22 RT: 0,50-0,74 AV: 8 NL: 2,98E5
T: + c Full ms2 1163,00@23,00 [320,00-2000,00]



MS² de l'ion 774

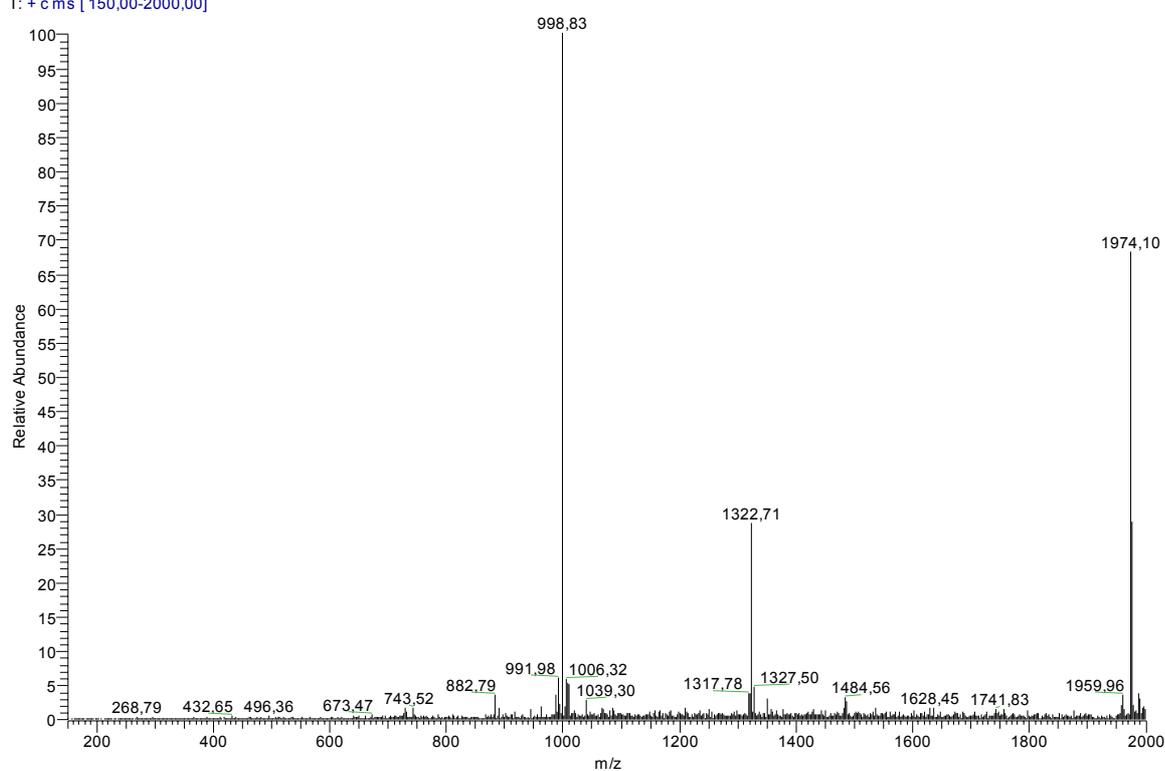
S13-10%HPLC5opt+TFAMS2-774 #3-7 RT: 0,10-0,25 AV: 5 NL: 8,08E4
T: + c Full ms2 774,00@26,00 [210,00-2000,00]



Spectres ESI-SM des peptaïbols déjà connus produits par *Trichoderma* MMS 151

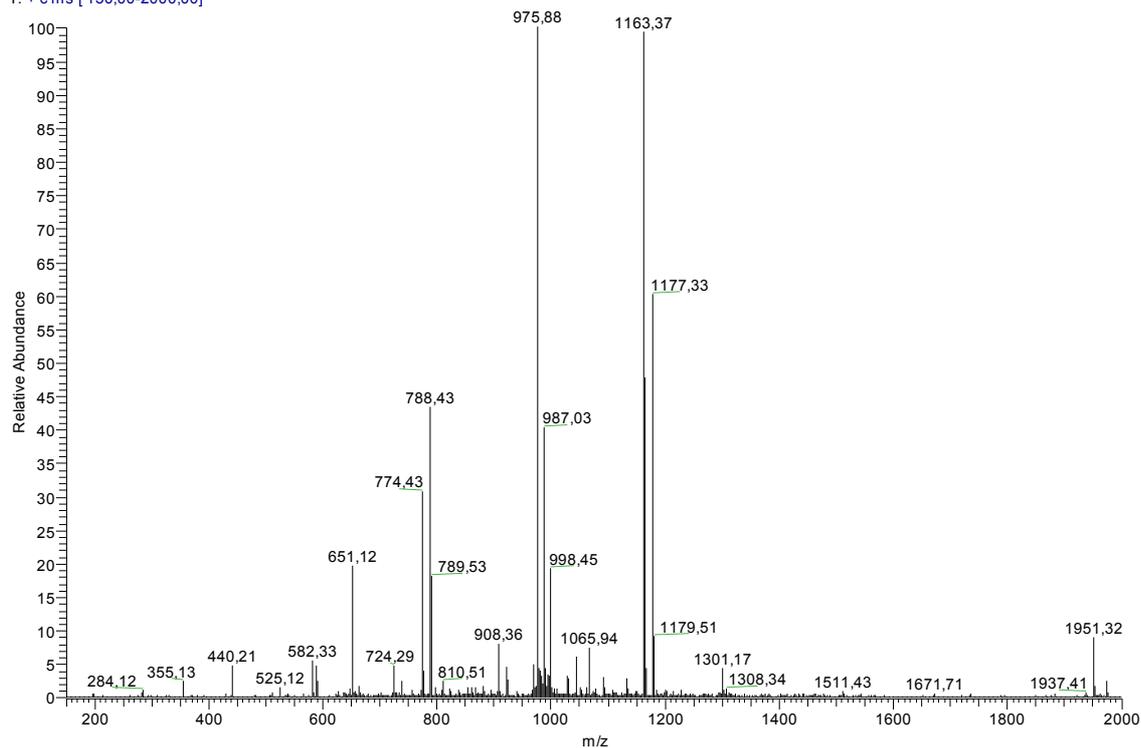
Fraction HPLC 6 peptides 6 et 7 Sans TFA, Full scan

S13-10%HPLC6optssAcFull #53 RT: 1,60 AV: 1 NL: 6,41E7
T: + c ms [150,00-2000,00]



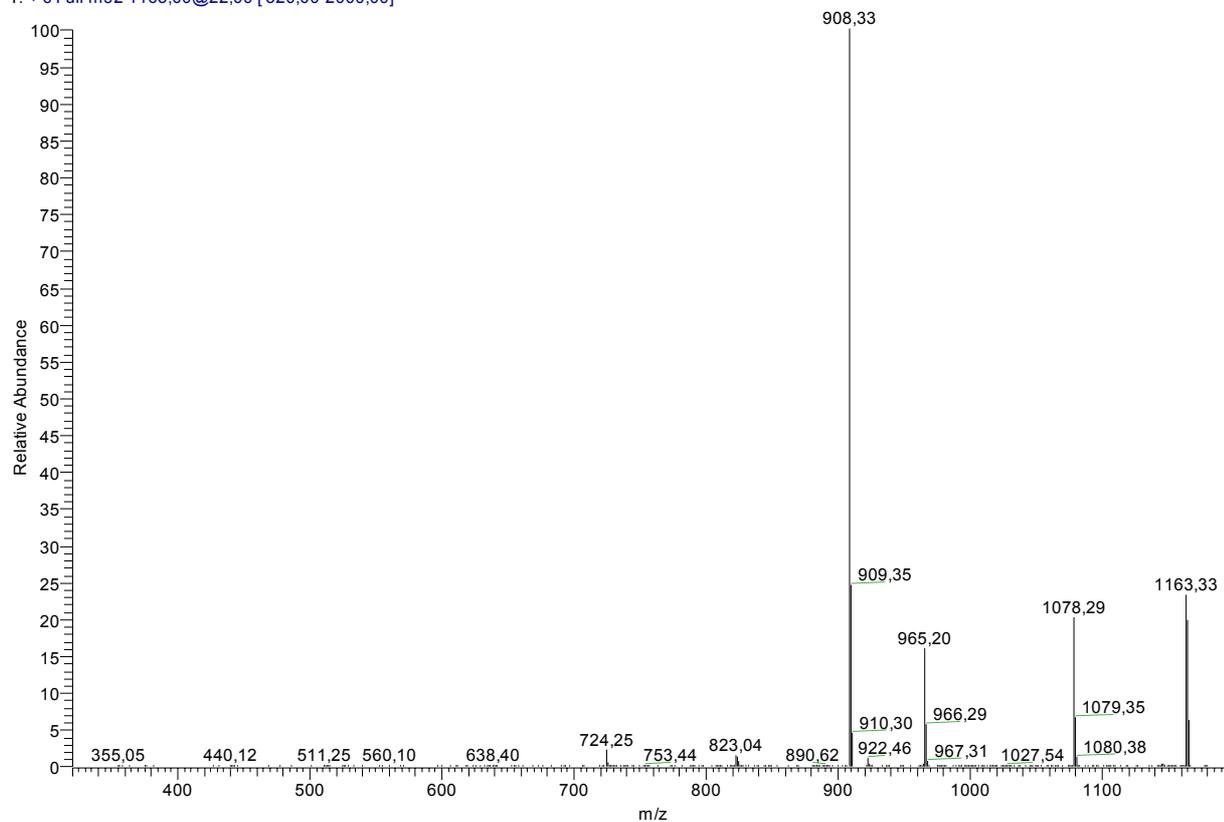
Après addition de TFA, Full scan

S13-10%HPLC6opt+TFAFull #26-70 RT: 0,76-2,08 AV: 45 NL: 2,88E7
T: + c ms [150,00-2000,00]



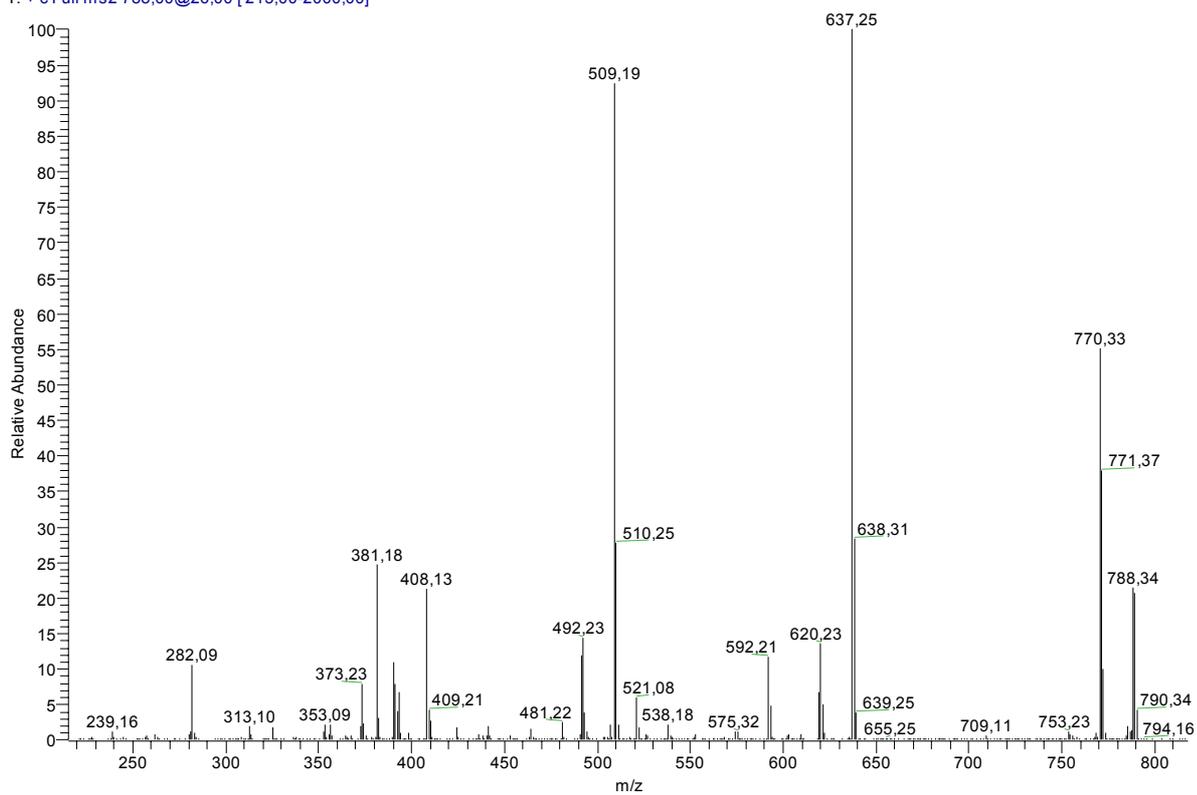
MS² de l'ion 1163

S13-10%HPLC6opt+TFAMS2-1163 #12 RT: 0,30 AV: 1 NL: 2,30E7
T: + c Full ms2 1163,00@22,00 [320,00-2000,00]



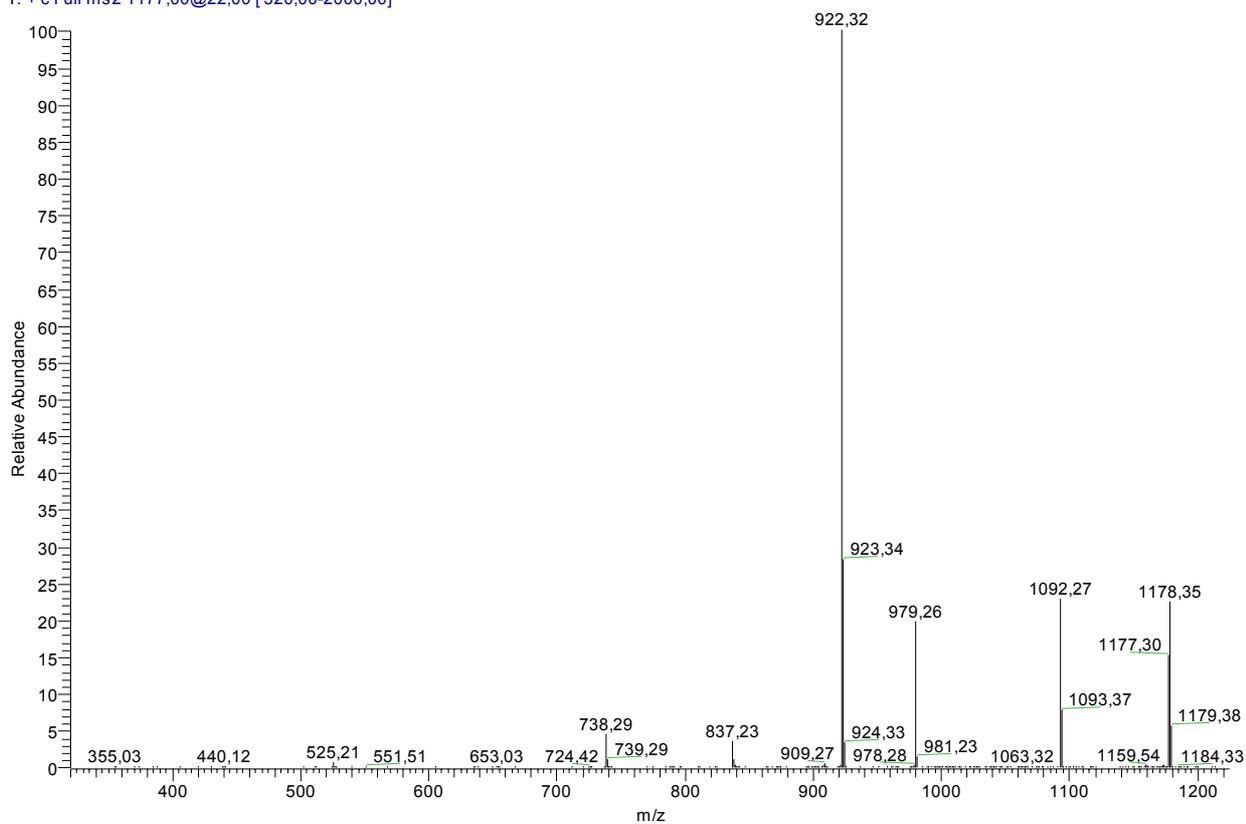
MS² de l'ion 788

S13-10%HPLC6opt+TFAMS2-788 #2-5 RT: 0,06-0,14 AV: 4 NL: 3,62E6
T: + c Full ms2 788,00@26,00 [215,00-2000,00]

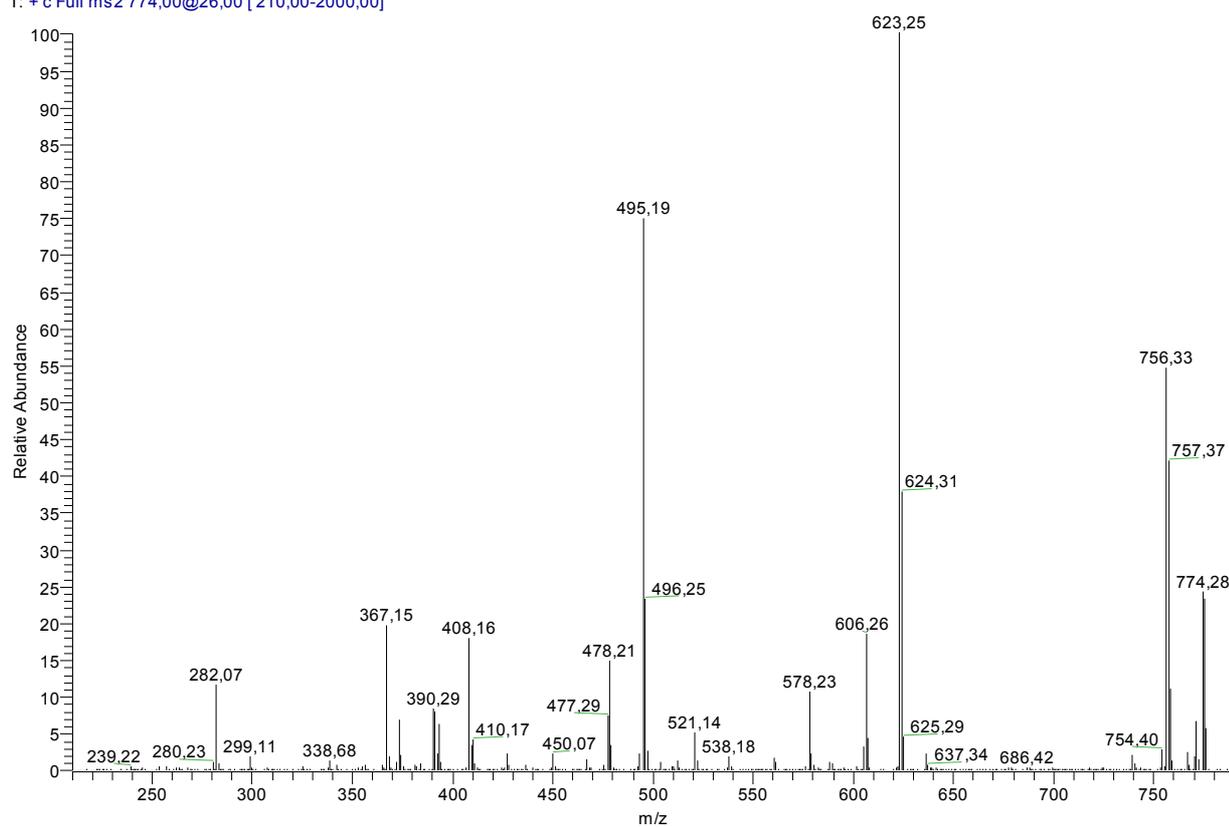


MS² de l'ion 1177

S13-10%HPLC6opt+TFAMS2-1177 #2 RT: 0,05 AV: 1 NL: 1,24E7
T: + c Full ms2 1177,00@22,00 [320,00-2000,00]

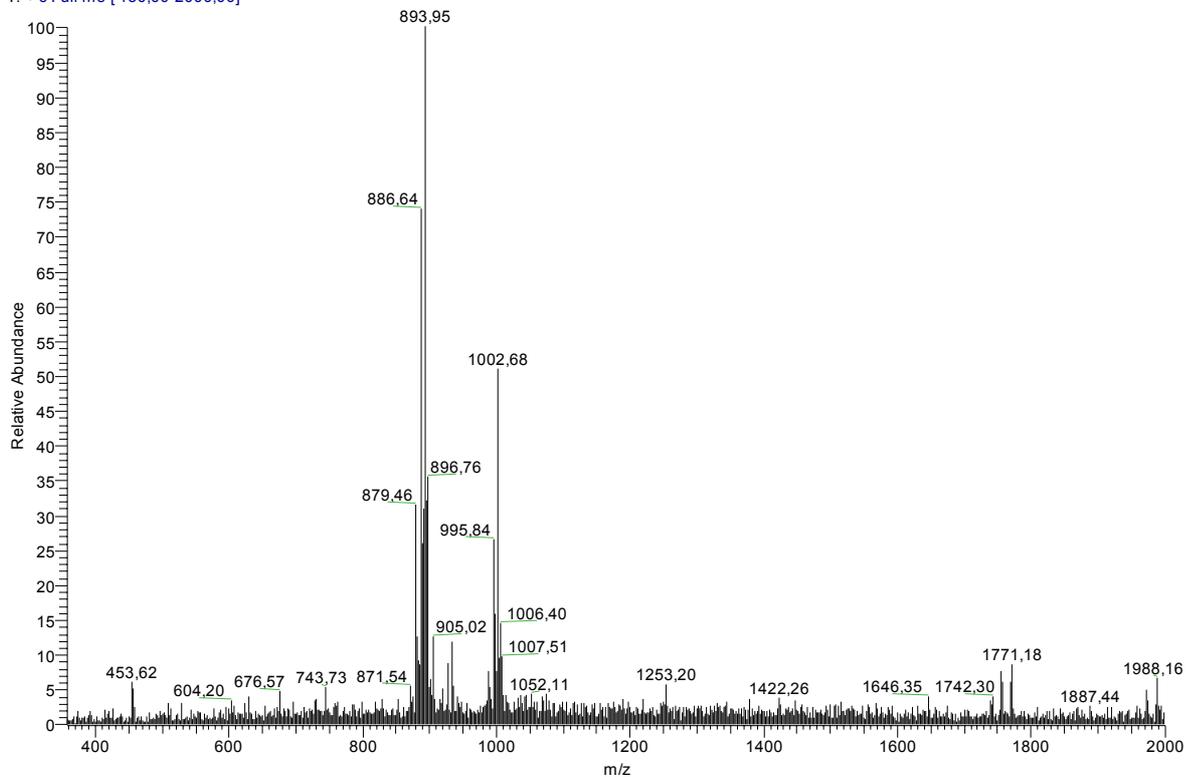
MS² de l'ion 774

S13-10%HPLC6opt+TFAMS2-774 #14 RT: 0,41 AV: 1 NL: 4,11E6
T: + c Full ms2 774,00@26,00 [210,00-2000,00]



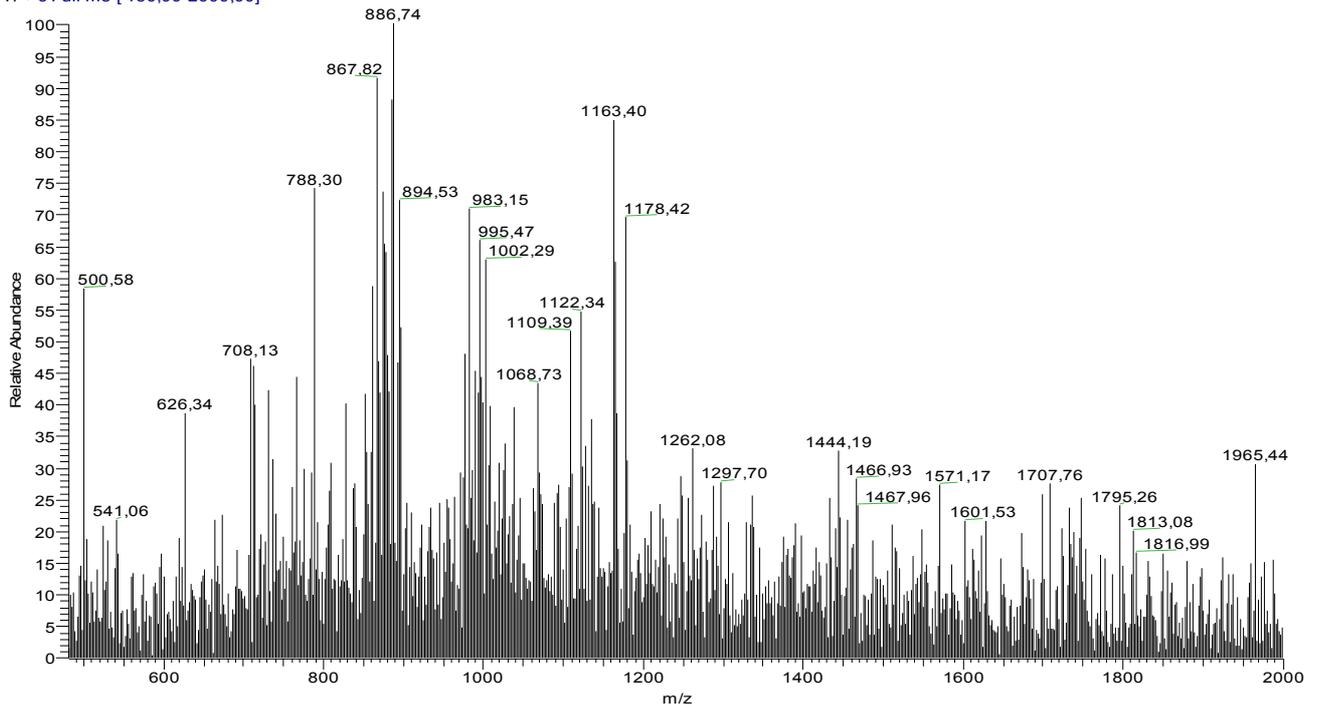
Spectres ESI-SM des peptaïbols déjà connus produits par *Trichoderma MMS 151***Fraction HPLC 7 peptides 8**
Sans TFA, Full scan

S13-10%HPLC7optssAcFull #42 RT: 1,25 AV: 1 NL: 2,64E7
T: + c Full ms [150,00-2000,00]



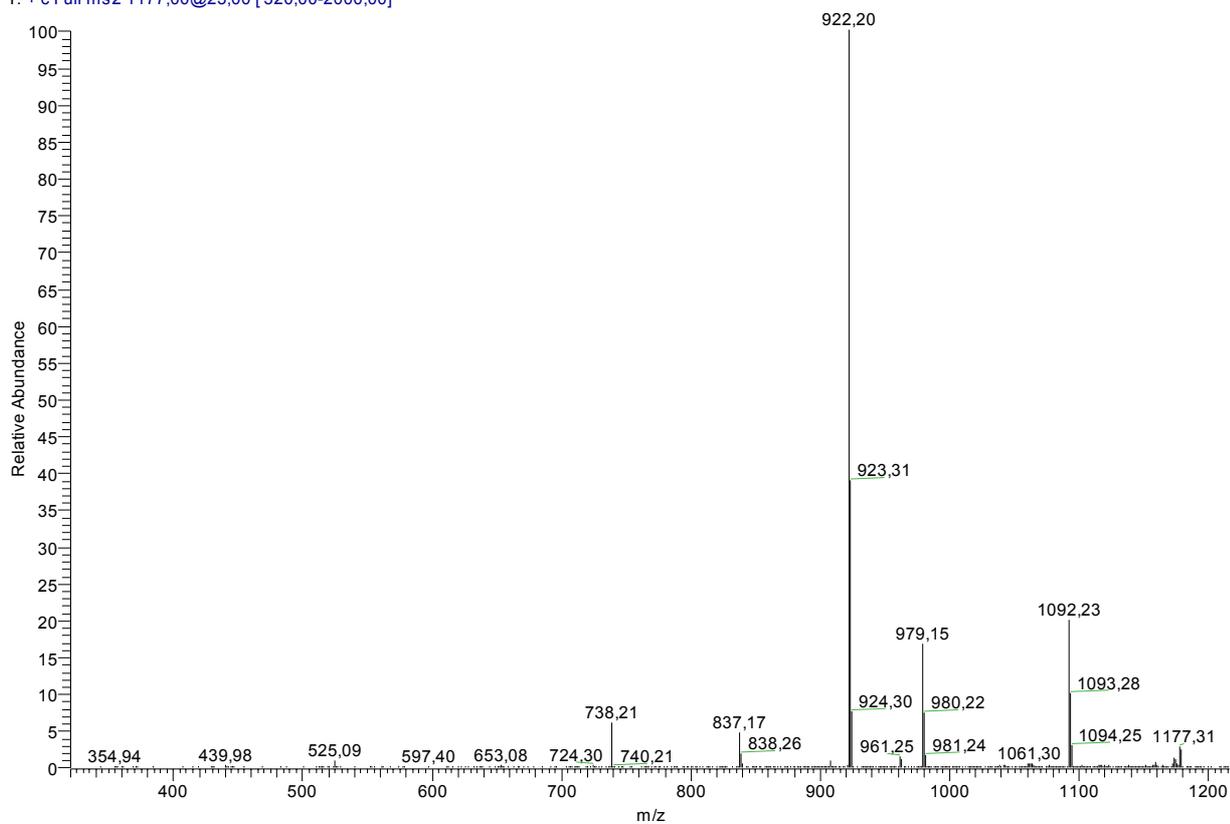
Après addition de TFA, Full scan

S13-10%HPLC7opt+TFAFull #41 RT: 1,12 AV: 1 NL: 2,35E6
T: + c Full ms [150,00-2000,00]

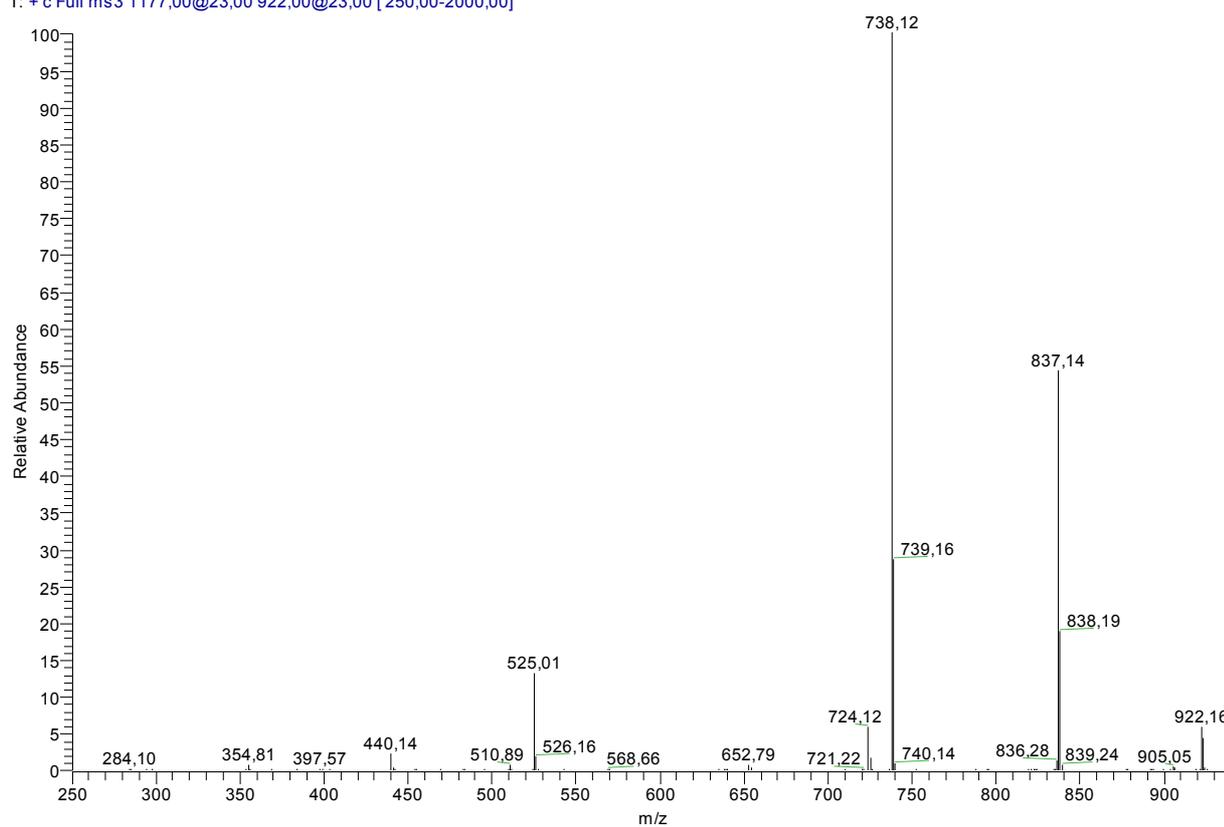


MS² de l'ion 1177

S13-10%HPLC7opt+TFAMS2-1177 #6-13 RT: 0,20-0,44 AV: 8 NL: 1,02E6
T: + c Full ms2 1177,00@23,00 [320,00-2000,00]

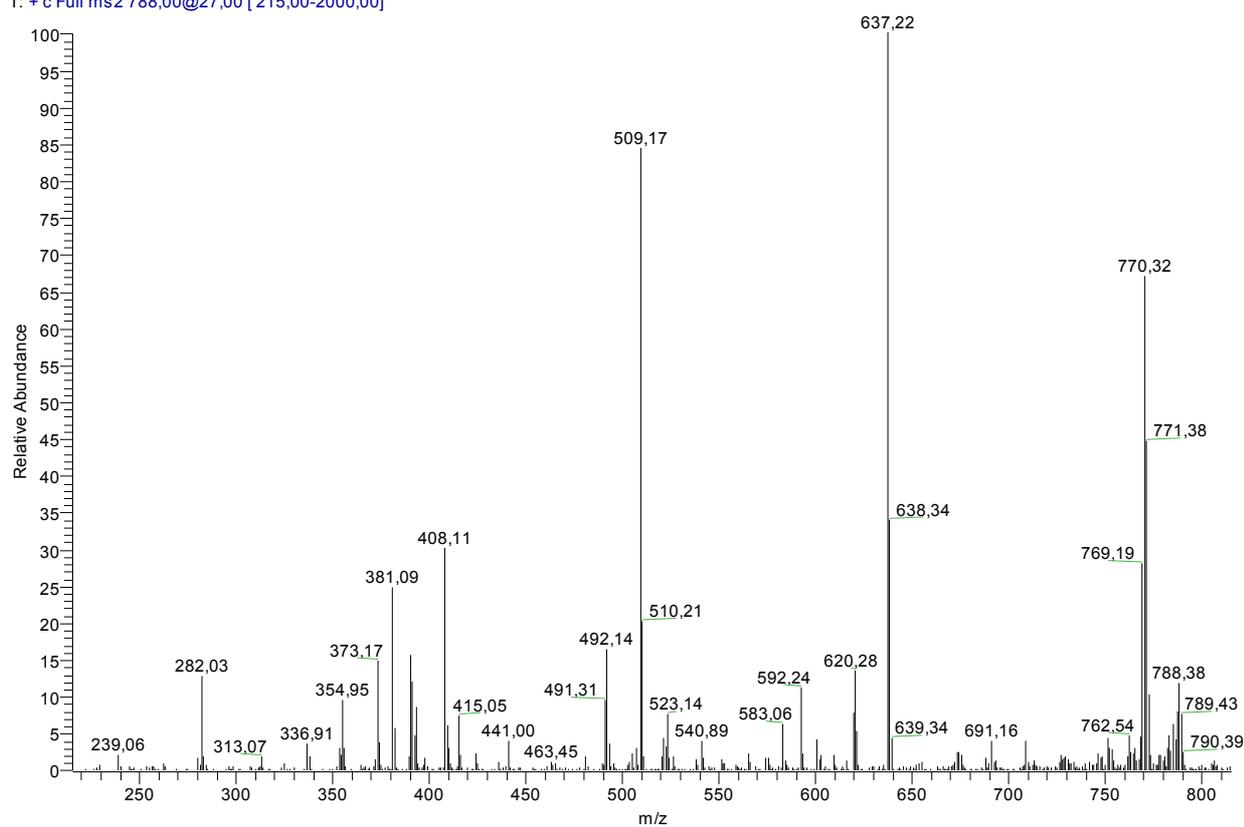
MS³ de l'ion 922

S13-10%HPLC7opt+TFAMS3-922 #60 RT: 2,15 AV: 1 NL: 7,04E5
T: + c Full ms3 1177,00@23,00 922,00@23,00 [250,00-2000,00]



MS² de l'ion 788

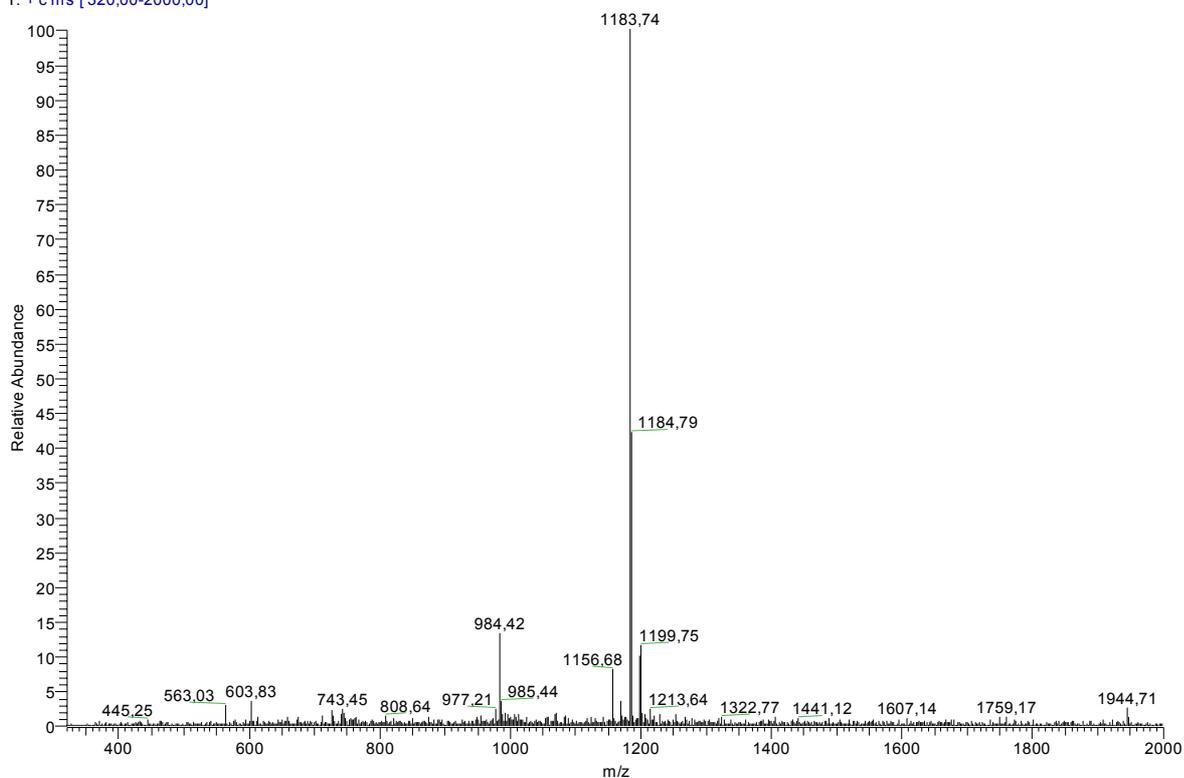
S13-10%HPLC7opt+TFAMS2-788 #96 RT: 3,35 AV: 1 NL: 4,02E5
T: + c Full ms2 788,00@27,00 [215,00-2000,00]



Spectres ESI-SM des peptaïbols déjà connus produits par *Trichoderma* MMS 204

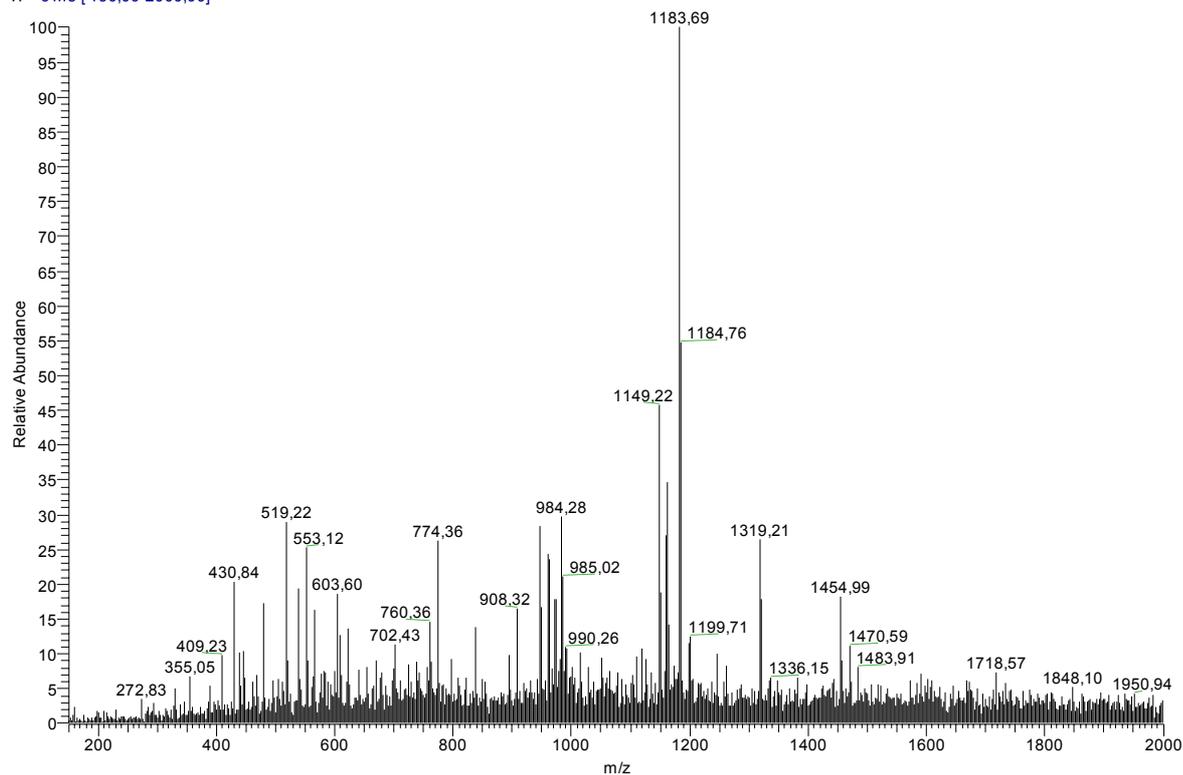
Fraction HPLC 2 peptides 1 Sans TFA, Full scan

Souche15HPLCopt2ssTFAFull #3 RT: 0,08 AV: 1 NL: 1,09E6
T: + c ms [320,00-2000,00]



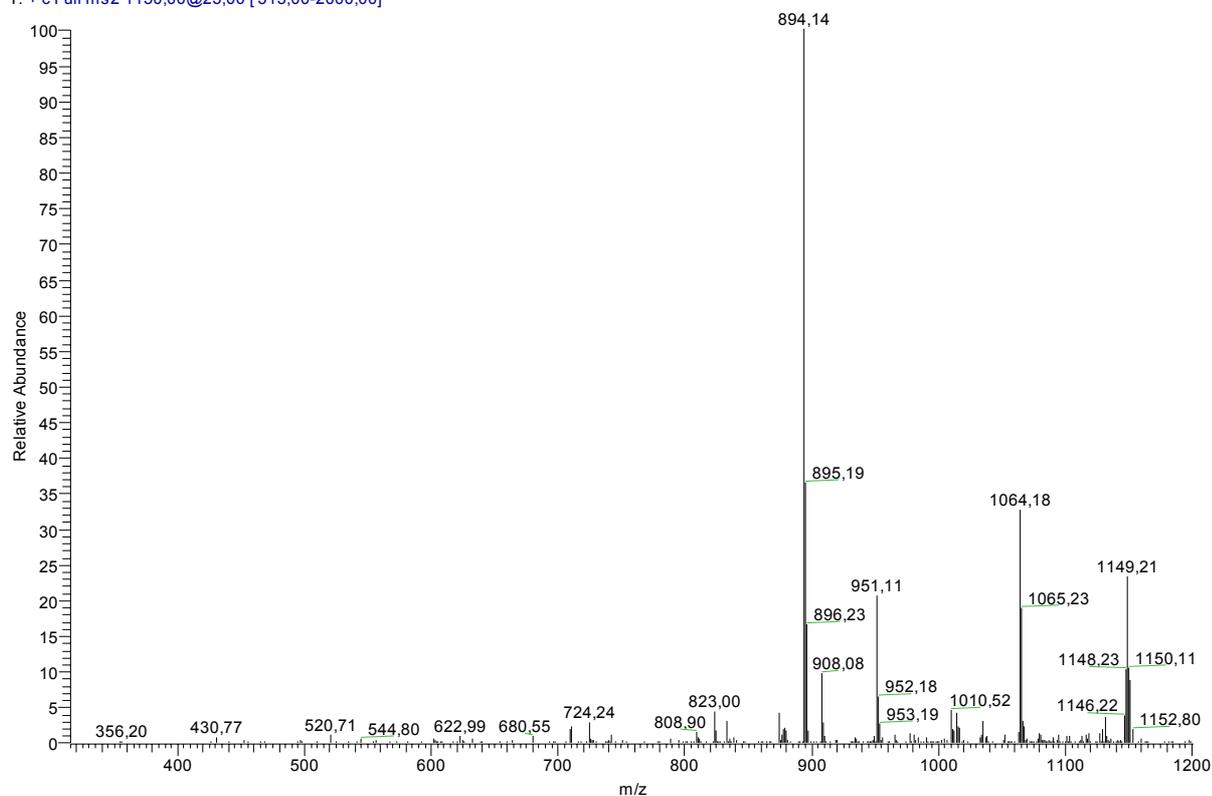
Après addition de TFA, Full scan

Souche15HPLCopt2+TFACFull_030801164408 #7-18 RT: 0,19-0,53 AV: 12 NL: 1,05E6
T: + c ms [150,00-2000,00]



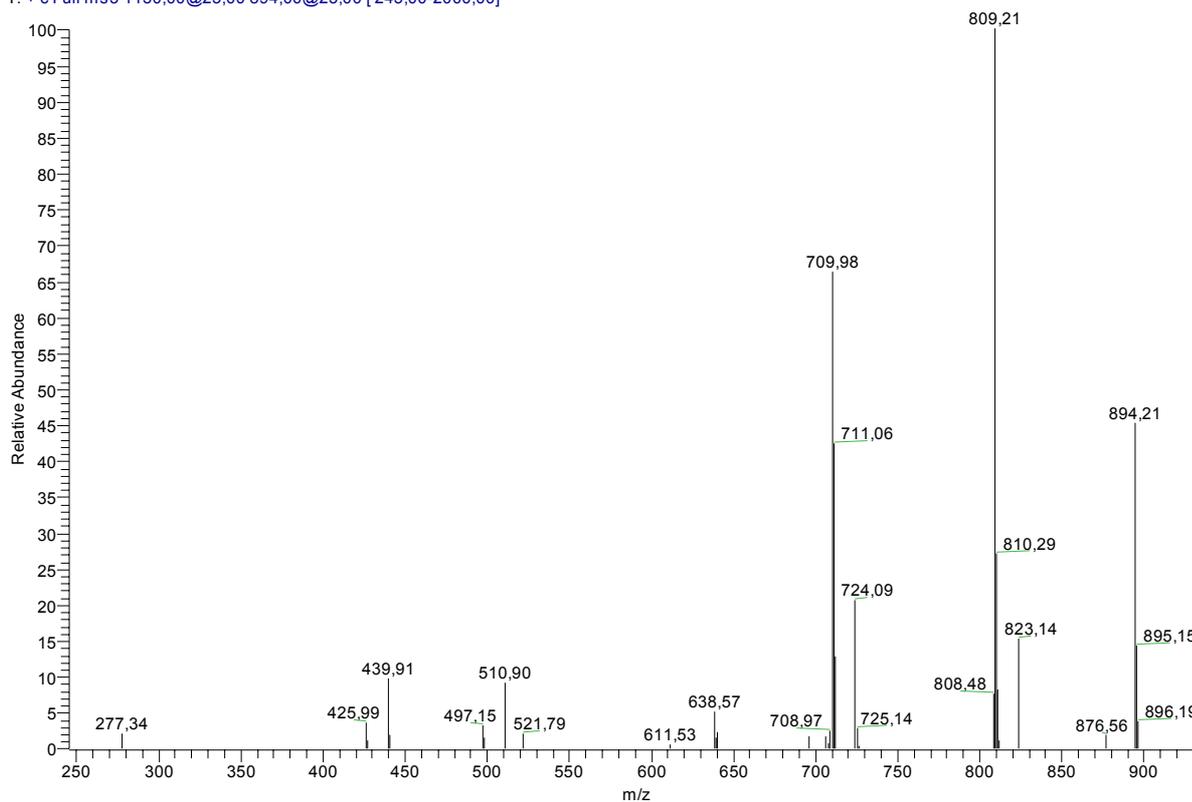
MS² de l'ion 1177

Souche15HPLCopt2+TFAMS2-1149 #10-15 RT: 0,27-0,40 AV: 6 NL: 2,27E5
T: + c Full ms2 1150,00@23,00 [315,00-2000,00]



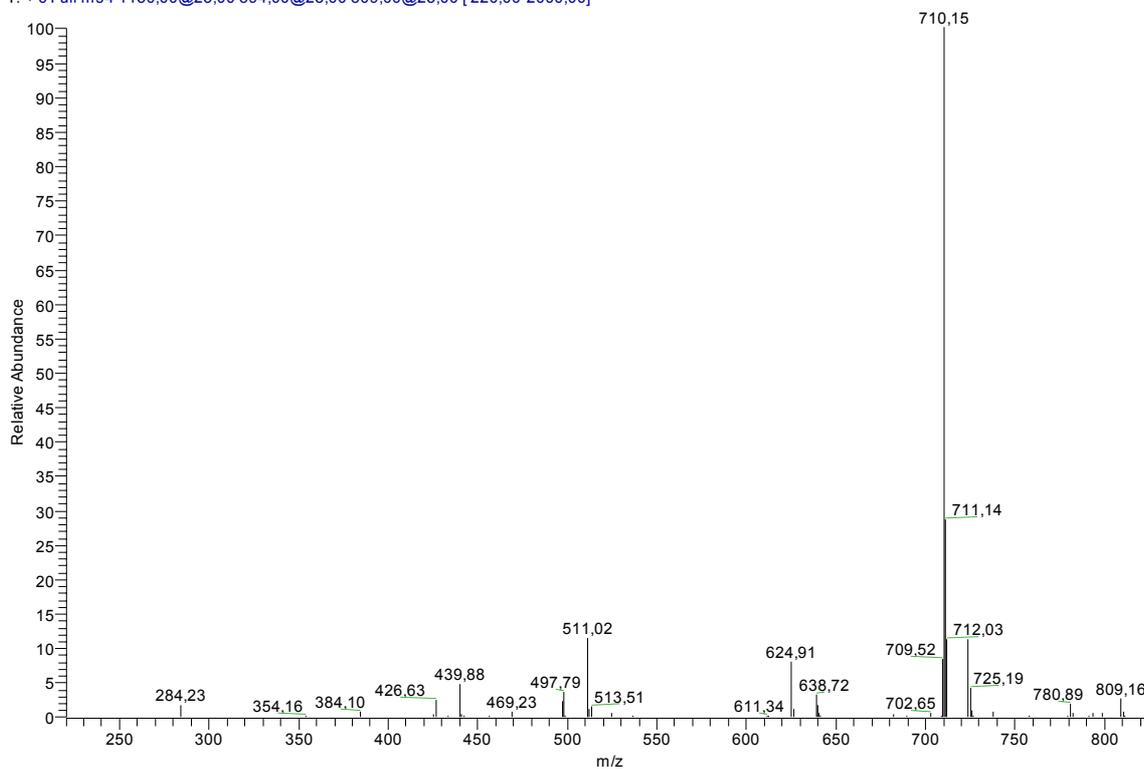
MS² de l'ion 1177

Souche15HPLCopt2+TFAMS3-894 #1-6 RT: 0,02-0,17 AV: 6 NL: 2,90E4
T: + c Full ms3 1150,00@23,00 894,00@23,00 [245,00-2000,00]



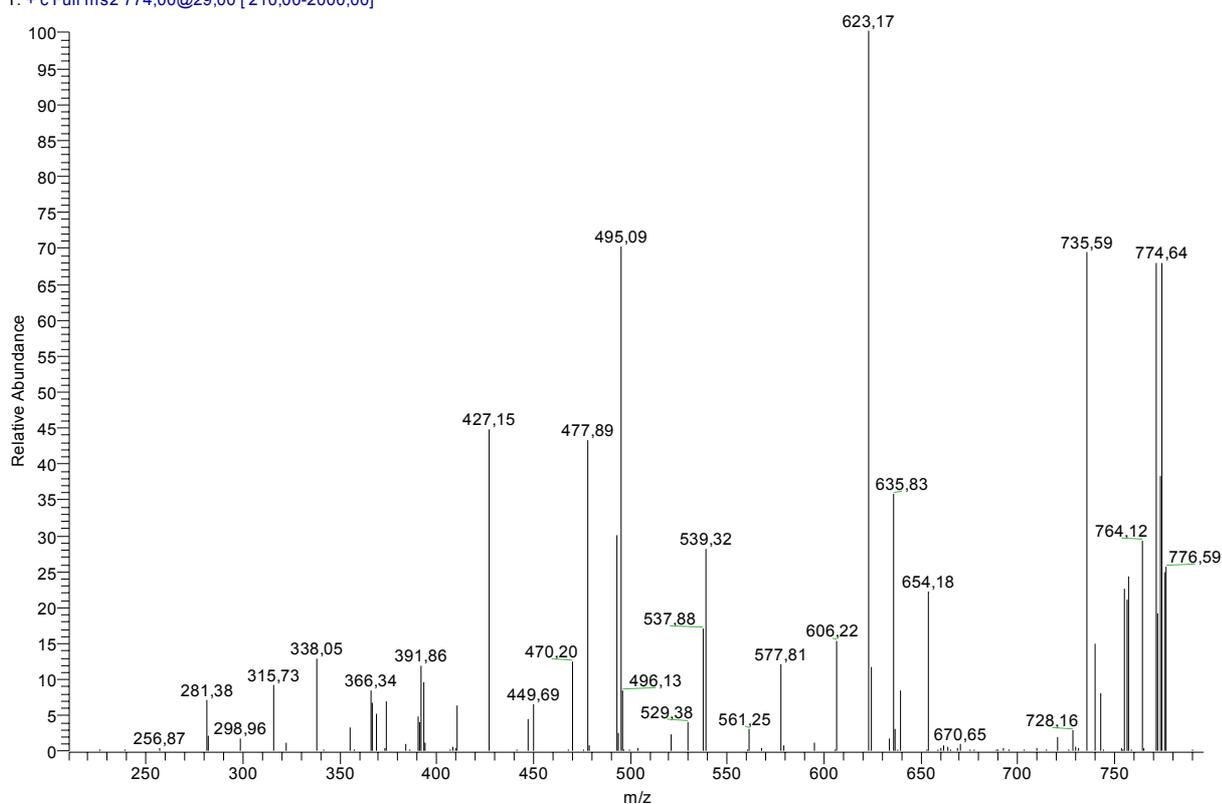
MS³ de l'ion 809

Souche15HPLCopt2+TFAMS4-809 #20 RT: 0,66 AV: 1 NL: 1,02E5
T: + c Full ms4 1150,00@23,00 894,00@23,00 809,00@23,00 [220,00-2000,00]



MS² de l'ion 774

Souche15HPLCopt2+TFAMS2-774 #18 RT: 0,49 AV: 1 NL: 6,58E3
T: + c Full ms2 774,00@29,00 [210,00-2000,00]



Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*.

Ce travail est consacré à l'étude chimique des peptaïbols sécrétés par des souches de *Trichoderma* endémiques des zones conchylicoles de Loire-Atlantique. La stratégie adoptée a permis de réaliser :

- Un échantillonnage, à partir de la mycothèque du SMAB (Substances Marines à Activité Biologique), de souches de *Trichoderma* productrices de peptaïbols dans l'estuaire de la Loire. Neuf souches représentatives ont été sélectionnées. En fonction de leurs contenus en peptaïbols, elles ont été réparties en 4 ensembles, puis une « souche représentative » de chaque ensemble a été choisie pour la suite du travail.
- Une optimisation des protocoles nécessaires à la production *in vitro* des peptaïbols. La mise au point d'un mode de fermentation sur milieu gélosé a permis d'augmenter le rendement de cette biosynthèse.
- Une optimisation des conditions de purification des peptaïbols. Des protocoles simplifiés de pré-purification, de purification par chromatographie en phase liquide (CLHP) ont permis la préparation d'échantillons analysable par spectrométrie de masse.
- Une identification structurale des peptaïbols produits, grâce au séquençage par spectrométrie de masse, l'ionisation étant réalisée par électronebulisation ou électrospray (ESI) et l'analyseur étant constitué par une trappe d'ions permettant une analyse SMⁿ. Cette analyse a pu être conduite sur des mélanges de peptaïbols de structure très proche (phénomène de microhétérogénéité). Une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS-EI) a permis de préciser la nature des acides aminés (AA) de même masse (Valine ou Isovaline ; Leucine ou Isoleucine).

Pour les quatre souches de *Trichoderma* étudiées, 30 peptaïbols ont été mis en évidence dont 24 sont de nouvelles molécules. Ils appartiennent à 5 familles de peptaïbols déjà décrites : les trichokonines, les trichosporines, les hypomurocines, les trichorovines et les suzukacillines. Vingt et un sont à longue séquence (18 à 20 AA) dont 16 sont nouveaux. Neuf sont à courte séquence (11 AA) dont 8 présentent des structures assez originales pour nous permettre de proposer une nouvelle famille, celle des trichobrachines.

Mots clés : Zones conchylicoles, estuaire de la Loire, mycothèque, champignons marins, *Trichoderma* sp., peptaïbols, production, séquençage, spectrométrie de masse.

Evaluation of the fungal risk in shellfish farming areas: toxic substances from *Trichoderma* sp. marine strain

This work is devoted to the chemical study of peptaibols produced by endemic *Trichoderma* strains in the Loire-Atlantique shellfish farming areas. The adopted strategy made possible to realize:

- A sampling from the marine fungal collection of SMAB (Substances Marines à Activité Biologique) of *Trichoderma* strains with peptaibols production in the Loire estuary. Nine representative strains were selected. According to their peptaibols production, they were divided into 4 sets; a "representative strain" of each set was then selected for next steps.
- The optimization of the used methods for the peptaibols *in vitro* production. The development of a fermentation mode on agar medium increases the biosynthesis output.
- An optimization of the peptaibol purification conditions. Simplified methods of pre-purification and purification by high performance liquid chromatography (HPLC) allowed the preparation of analysable samples by mass spectrometry.
- The structural identification of the produced peptaibols by use of mass spectrometry sequencing; electro spray ionisation mode (ESI) and ion trap analyser allowing MSⁿ analysis. The latter make possible the identification of peptaibols with very similar structures (due to the peptaibols microheterogeneity phenomenon). The use of coupled gas chromatography to mass spectrometry (GC-MS-IE) allows the differentiation of the amino acids (AA) of the same mass (Valine or Isovaline; Leucine or Isoleucine).

Thirty peptaibols produced by the four studied *Trichoderma* strains were identified. 24 of which, are new molecules and belong to 5 already described families: trichokonines, trichosporines, hypomurocines, trichorovines and suzukacillines. 21 are long sequences peptaibols (18 to 20 AA) including 16 new structures. Among the 9 remaining peptaibols with short sequence (11 AA), 8 have enough original structures to enabling us to propose a new peptaibol family: the trichobrachine's.

Key words: Shellfish farming areas, Loire estuarine zones, fungal collection, marine fungi, *Trichoderma* sp., peptaibols, production, sequencing, mass spectrometry.

Key words: Shellfish farming areas, Loire estuarine zones, fungal collection, marine fungi, *Trichoderma* sp., peptaibols,

Discipline : Pharmacie.

Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, SMAB, EA2160, Faculté de pharmacie, 1 rue G. Veil - BP 53508, Nantes, F44000 France.