

UNIVERSITE DE NANTES  
UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

---

MICROMYCETES ET METABOLITES FONGIQUES  
EN MILIEU MARIN

– ISOLEMENT DE SOUCHES – MISE EN CULTURE –  
PRODUCTION, IDENTIFICATION ET EVALUATION PHARMACOLOGIQUE  
DE LIPIDES, ACIDES GRAS ET PEPTIDES

---

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale Chimie Biologie  
Mention Sciences de la Vie et de la Santé  
Discipline Pharmacie  
Spécialité Mycologie et Mycochimie

*présentée  
et soutenue publiquement par*

**RUIZ Nicolas**

Le 21 juin 2007, devant le jury ci-dessous

*Président*            M. VERITE P, Professeur, Université de Nantes

*Rapporteurs*        M. BOUSTIE J., Professeur, Université de Rennes I  
                             M. GAYDOU E. M., Professeur, Université d'Aix-Marseille III

*Examineurs*        M. VERITE P., Professeur, Université de Rouen  
                             M. POUCHUS Y. F., Professeur, Université de Nantes  
                             M. BARNATHAN G., Professeur, Université de Nantes

*Directeurs de thèse*    M. POUCHUS Y. F., Professeur, Université de Nantes  
                             M. BARNATHAN G., Professeur, Université de Nantes

# Sommaire

<b>Abréviations</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des Figures</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des Tableaux</b>	<b>xii</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Partie 1- Microfonge saprotrophe des zones conchylicoles : étude et évolution, sélection de souches, mise en culture</b>	<b>4</b>
<i>P1-I- Champignons et écosystèmes marins – étude bibliographique</i>	5
I-1- Les champignons : définition générale	5
I-2- Classification des champignons	6
I-2-1- Les Mycétozoaires	6
I-2-2- Les champignons-algues	7
I-2-3- Les Eumycètes	7
I-3- La notion de « champignons marins »	8
I-4- Les champignons en milieu marin	9
I-4-1- Adaptation au milieu	9
I-4-2- Relations trophiques	10
I-4-2-1- Saprotriphisme	10
I-4-2-2- Parasitisme	10
I-4-2-3- Symbiose	10
I-4-3- Les champignons saprotrophes isolés du milieu marin	11
I-4-3-1- Champignons arénicoles	11
I-4-3-2- Champignons dégradant les substrats végétaux	11
I-4-3-3- Champignons dégradant les substrats animaux	12
I-5- Les moisissures terrestres en milieu marin	13
<i>P1-II- Etude de la microfonge saprotrophe</i>	15
II-1- Prélèvements, échantillonnage et isolements des champignons	15
II-1-1- Description des sites	15
II-1-2- Echantillonnage	16
II-1-3- Préparation et mise en culture des échantillons	16
II-1-4- Isolement, identification et conservation des champignons	17
II-2- Résultats globaux	18
II-3- Analyse des résultats	19
II-3-1- Composition globale de la microfonge	19
II-3-2- Etude en fonction des sites de prélèvements	21
II-3-3- Etude en fonction du type de prélèvement	22
II-3-4- Etude en fonction des saisons	23
II-4- Conclusion	24
<i>P1-III- Champignons étudiés pour leurs métabolites</i>	25
III-1- Choix des souches	25
III-2- <i>Penicillium vermiculatum</i> et <i>Penicillium citreonigrum</i>	26
III-2-1- Classification	26
III-2-2- Isolement et identification des souches étudiées	27
III-2-3- Morphologie	27
III-2-3-1-1- Aspect macroscopique	27
III-2-3-1-2- Aspect microscopique	28
III-3- <i>Trichoderma longibrachiatum</i> et <i>Trichoderma harzianum</i>	29
III-3-1- Classification	29
III-3-2- Isolement et identification des souches étudiées	30
III-3-3- Morphologie	31
III-3-3-1- Aspect macroscopique	31
III-3-3-2- Aspect microscopique	32
III-4- Mise en culture des souches sélectionnées	33

III-4-1-	Choix du milieu	33
III-4-1-1-	Type de milieu de fermentation	33
III-4-1-2-	Qualité du milieu de culture	33
III-4-2-	Conditions de cultures	34
III-4-2-1-	Milieu de base	34
III-4-2-2-	Milieus comparatifs	34
<b>Partie 2-</b>	<b>Etude des lipides de champignons des zones conchylicoles</b>	<b>36</b>
<i>P2-I-</i>	<i>Etude bibliographique</i>	37
I-1-	Les lipides	37
I-1-1-	Définition	37
I-1-1-1-	Classification selon les caractères de la chaîne acyle	37
I-1-1-1-1-	Lipides simples (insaponifiables)	37
I-1-1-1-2-	Lipides acylés	37
I-1-1-2-	Classification en lipides neutres et polaires	37
I-1-1-2-1-	Lipides neutres	37
I-1-1-2-2-	Lipides polaires	37
I-1-2-	Triglycérides	38
I-1-3-	Phospholipides	39
I-1-4-	Les acides gras	40
I-1-4-1-	Généralités	40
I-1-4-2-	Nomenclatures	40
I-1-4-3-	Biosynthèse	41
I-1-4-4-	Sources naturelles	41
I-1-4-5-	Rôles biologiques	42
I-1-4-6-	Notion d'acides gras essentiels	43
I-2-	Lipides fongiques	46
I-2-1-	Mise au point sur les lipides des champignons	46
I-2-1-1-	Stérols fongiques	46
I-2-1-2-	Glycolipides fongiques	47
I-2-2-	Acides gras fongiques	48
<i>P2-II-</i>	<i>Méthodologies utilisées</i>	51
II-1-	Production de la biomasse fongique	51
II-1-1-	Mise en culture des souches sur milieu solide	51
II-1-1-1-	Mise en culture des <i>Trichoderma</i>	51
II-1-1-2-	Mise en culture des <i>Penicillium</i>	51
II-1-2-	Mise en culture sur milieu liquide	51
II-2-	Obtention des lipides totaux	52
II-2-1-	Récupération de la biomasse sur milieu solide	52
II-2-1-1-	Souches de <i>Trichoderma</i>	52
II-2-1-2-	Souches de <i>Penicillium</i>	52
II-2-2-	Arrêt des cultures en milieu liquide	52
II-2-3-	Extraction des lipides	52
II-2-4-	Evaluation de la quantité de biomasse produite et de la proportion lipidique	53
II-3-	Séparation des lipides en classes	54
II-4-	Etude des acides gras	55
II-4-1-	Obtention des acides gras	55
II-4-1-1-	Acides gras des lipides totaux et des triglycérides	55
II-4-1-2-	Acides gras des phospholipides	56
II-4-2-	Analyse des acides gras par CPG/SM	56
II-4-3-	Dérivés d'acides gras utilisés	57
II-4-4-	Méthodologie appliquée à l'analyse des acides gras	58
II-4-4-1-	Longueur de chaîne équivalente des acides gras en CPG/SM	58
II-4-4-2-	Analyse des spectres de masse des grandes familles d'acides gras	60
II-4-4-2-1-	Acides gras saturés	60
II-4-4-2-2-	Acides gras ramifiés	60
II-4-4-2-3-	Acides gras insaturés	62
II-4-4-2-4-	Acides gras 2-hydroxylés	65
II-4-4-3-	Mise en évidence de la présence d'acides gras conjugués	66
II-4-4-3-1-	Comparaison des profils chromatographiques	66
II-4-4-3-2-	Analyse des spectres de masse des acides gras conjugués diinsaturés	68

II-4-4-3-3-	Analyse des spectres de masse des acides gras conjugués triinsaturés	72
II-4-5-	Concentration des acides gras par complexation avec l'urée	73
II-4-6-	Chromatographie liquide haute performance	73
II-4-7-	Activités biologiques	75
II-4-7-1-	Cytotoxicité par le test colorimétrique au MMT	75
II-4-7-2-	Cytotoxicité par le test de colorimétrique au rouge neutre	76
<b>P2-III-</b>	<b>Lipides fongiques : résultats obtenus</b>	<b>77</b>
III-1-	Obtention des lipides totaux et séparation en classes lipidiques	77
III-1-1-	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> et <i>T. harzianum</i>	77
III-1-2-	<i>Penicillium vermiculatum</i> et <i>P. citreonigrum</i>	78
III-2-	Etude des acides gras	79
III-2-1-	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	79
III-2-1-1-	Culture en milieu solide	79
III-2-1-2-	Culture en milieu liquide	82
III-2-2-	<i>Trichoderma harzianum</i>	85
III-2-3-	<i>Penicillium vermiculatum</i>	87
III-2-4-	<i>Penicillium citreonigrum</i>	91
III-2-4-1-	Composition en acides gras des triglycérides et des phospholipides	91
III-2-4-1-1-	Enrichissement en acide 4-Me-6,8-16:2 par inclusion dans l'urée	102
III-2-4-1-2-	Purification de l'acide 4-Me-6,8-16:2 par CLHP-Ag <sup>+</sup>	106
III-2-4-2-	Actions sur la viabilité cellulaire	109
III-2-4-2-1-	Test de cytotoxicité sur cellules KB	109
III-2-4-2-2-	Test de cytotoxicité sur cellules KMS 11 (myélome) et GBM (gliome)	109
III-2-4-2-3-	Tests de cytotoxicité sur adénocarcinome du colon (cellules LS174T)	109
III-2-4-3-	Mise en évidence de la présence de plasmalogènes	110
<b>P2-IV-</b>	<b>Discussion</b>	<b>113</b>
IV-1-	Comparaison des cultures de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en milieu solide et liquide	113
IV-1-1-	Production de biomasse, proportion de lipides et classes lipidiques	113
IV-1-2-	Comparaison des profils d'acides gras	114
IV-2-	Comparaison des profils lipidiques des quatre souches cultivées en milieu solide	116
IV-2-1-	Production de biomasse et proportion des lipides totaux	116
IV-2-2-	Séparation des lipides en classes	118
IV-2-3-	Composition en acides gras	119
IV-2-3-1-	Acides gras saturés	120
IV-2-3-2-	Acides gras monoinsaturés	122
IV-2-3-3-	Acides gras diinsaturés	125
IV-2-3-4-	Acides gras 2-hydroxylés	127
IV-2-3-5-	Acides gras conjugués	128
IV-2-3-5-1-	Acides gras conjugués diinsaturés	129
IV-2-3-5-2-	Acides gras conjugués triinsaturés	131
IV-2-3-5-3-	Originalité de la souche <i>Penicillium citreonigrum</i>	132
IV-2-4-	Mise en évidence de plasmalogènes	134
<b>P2-V-</b>	<b>Lipides et acides gras fongiques : conclusion et perspectives</b>	<b>136</b>
<b>Partie 3-</b>	<b>Peptides fongiques : peptaïbols de <i>Trichoderma</i> sp.</b>	<b>139</b>
<b>P3-I-</b>	<b>Etude bibliographique</b>	<b>140</b>
I-1-	Les peptaïbols	140
I-1-1-	Définition et classification	140
I-1-2-	Biosynthèse	143
I-1-3-	Organismes producteurs	144
I-2-	Les peptaïbols des genres <i>Trichoderma</i> / <i>Hypocrea</i>	146
I-2-1-	Peptaïbols à courtes séquences (11-14 résidus)	148
I-2-1-1-	Peptaïbols à 11 résidus	149
I-2-1-2-	Peptaïbols à 12 résidus	150
I-2-1-3-	Peptaïbols à 13 résidus	150
I-2-1-4-	Peptaïbols à 14 résidus	151
I-2-1-5-	Bilan	151
I-2-2-	Les peptaïbols à longues séquences (18 - 20 résidus)	152
I-2-2-1-	Peptaïbols à 20 résidus	152
I-2-2-2-	Peptaïbols à 19 résidus	154

I-2-2-3-	Peptaïbols à 18 résidus	155
I-3-	Activités biologiques des peptaïbols	157
I-3-1-	Conformation des peptaïbols	157
I-3-2-	Propriétés membranaires des peptaïbols	157
I-3-3-	Activités biologiques découlant des propriétés membranaires des peptaïbols	160
I-3-3-1-	Activités antibiotiques	160
I-3-3-1-1-	Activités antibactériennes	160
I-3-3-1-2-	Activités antifongiques	162
I-3-3-1-3-	Activités antivirales et antiparasitaires	162
I-3-3-2-	Activités cytotoxiques	163
I-3-3-3-	Activités sur souris	163
I-3-3-4-	Toxicité sur larves	164
I-3-3-5-	Bilan	165
P3-II-	<i>Méthodologies utilisées</i>	166
II-1-	Obtention des peptaïbols	166
II-1-1-	Chromatographie liquide sur colonne ouverte	166
II-1-2-	Purification par CLHP	166
II-2-	Détection des peptaïbols dans les fractions chromatographiques	167
II-2-1-	Analyses CCM	167
II-2-2-	Détection des peptaïbols par SM	167
II-3-	Séquençage des peptaïbols	171
II-3-1-	Séquençage par spectrométrie de masse	171
II-3-2-	Fragmentations SM <sup>n</sup>	174
II-3-3-	CID	174
II-3-4-	Etablissement des séquences	175
II-3-4-1-	Résolution de la microhétérogénéité : cascade de fragmentation (SM <sup>n</sup> / CID-SM) - graphes de filiation	175
II-3-4-2-	Séquences simples : séquençage par fragmentation (SM <sup>2</sup> )	179
II-3-5-	Analyse de la composition élémentaire en acides aminés par CPG/SM	180
II-4-	Activités biologiques	183
II-4-1-	Toxicité aiguë sur larves de diptères	183
II-4-2-	Test comportemental chez la souris	183
II-4-3-	Cytotoxicité sur cellules KB	184
II-4-4-	Activité antibactérienne	184
II-4-5-	Activité antifongique	184
P3-III-	<i>Peptaïbols de Trichoderma sp. : résultats obtenus</i>	186
III-1-	Recherche des peptaïbols dans les fractions lipophiles	186
III-2-	Obtention des peptaïbols et préanalyses par spectrométrie de masse	188
III-2-1-	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	188
III-2-1-1-	Fractions acétone	188
III-2-1-1-1-	CLHP sur la fraction TLA2-5	189
III-2-1-1-2-	CLHP sur la fraction TLA3-1	191
III-2-1-2-	Fraction méthanol	194
III-2-1-3-	Synthèse des étapes séparatives des peptaïbols produits par <i>T. longibrachiatum</i>	197
III-3-	Validation du protocole d'obtention des peptaïbols	198
III-3-1-	<i>Trichoderma harzianum</i>	200
III-3-1-1-	Fraction acétone	200
III-3-1-2-	Fraction méthanol	201
III-3-1-2-1-	Fraction THM2-4	202
III-3-1-2-2-	Fraction THM2-5	202
III-3-1-3-	Synthèse des étapes de séparation des peptaïbols	203
III-4-	Analyse des peptaïbols courts	204
III-4-1-	Peptaïbols courts de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	204
III-4-1-1-	Peptaïbols à 11 résidus : fractions TLA3-2 à TLA3-6	204
III-4-1-1-1-	Ion <i>m/z</i> 1155	204
III-4-1-1-2-	Ion <i>m/z</i> 1169	205
III-4-1-1-3-	Ion <i>m/z</i> 1183	206
III-4-1-1-4-	Ion <i>m/z</i> 1197	207
III-4-1-1-5-	Ion <i>m/z</i> 1211	207
III-4-1-2-	Etude des sous-fractions TLA4-2 à TLA4-13	208
III-4-2-	Peptaïbols courts de <i>Trichoderma harzianum</i>	211
III-4-2-1-	Sous-fractions THA3-2 et THM2-4	211

III-4-2-1-1-	Ions <i>m/z</i> 1197	211
III-4-2-1-2-	Ion <i>m/z</i> 1211	212
III-4-2-1-3-	Ion <i>m/z</i> 1225	212
III-4-3-	Bilan des peptaïbols courts observés chez les souches de <i>Trichoderma</i> : trichobrachines et trichodharzines	213
III-5-	Analyse des peptaïbols longs	215
III-5-1-	Peptaïbols longs de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	215
III-5-1-1-	Peptaïbols à 18 résidus : Fraction TLA4-1	215
III-5-1-2-	Peptaïbols à 20 résidus : fractions TLM3-1 à TLM3-5	216
III-5-2-	<i>Trichoderma harzianum</i> : peptaïbols à 18 résidus	218
III-5-3-	Bilan des peptaïbols longs isolés des souches de <i>Trichoderma</i> : brachiatines, longibrachiatines et harzines	220
III-5-3-1-	Peptaïbols à 18 résidus	220
III-5-3-2-	Peptaïbols à 20 résidus	220
III-6-	Activités biologiques des peptaïbols	221
III-6-1-	Neurotoxicité	221
III-6-1-1-	Résultats des tests de toxicité aiguë sur larves de diptères	221
III-6-1-2-	Test comportemental sur souris	222
III-6-1-3-	Autres activités biologiques	223
P3-IV-	<i>Discussion</i>	224
IV-1-	Obtention des peptaïbols – comparaison des protocoles	224
IV-1-1-	Comparaison des milieux	225
IV-1-2-	Comparaison des protocoles d'extraction/purification	225
IV-1-3-	Comparaison des peptaïbols entre les deux souches	226
IV-1-3-1-	Peptaïbols à 11 résidus	226
IV-1-3-1-1-	Comparaison des profils de répartition des peptaïbols à 11 résidus	227
IV-1-3-1-2-	Séquençage et acides aminés constitutifs	227
IV-1-3-2-	Peptaïbols à 9 et 10 résidus chez <i>T. longibrachiatum</i>	230
IV-1-3-3-	Peptaïbols longs	232
IV-1-3-3-1-	Peptaïbols à 18 résidus	232
IV-1-3-3-2-	Peptaïbols à 20 résidus : <i>T. longibrachiatum</i>	233
IV-1-3-4-	Bilan global des peptaïbols produits par les deux souches de <i>Trichoderma</i>	234
IV-2-	Activités biologiques	235
IV-2-1-	Risque toxinique	235
IV-2-2-	Autres activités	235
IV-2-3-	Relation structure/activité	236
IV-2-3-1-	Longueur de chaîne	236
IV-2-3-2-	Hydrophobie des séquences	236
P3-V-	<i>Peptaïbols : conclusion et perspectives</i>	238
<b>Conclusion générale</b>		<b>241</b>
<b>Références bibliographiques</b>		<b>244</b>
<b>Annexes</b>		<b>268</b>
<i>Annexe 1 : Matériels utilisés</i>		269
□ Matériel chromatographique		269
□ Matériel spectrométrique		270
□ Solvants		270
□ Réactifs		270
□ Tests biologiques		270
<i>Annexe 2 : Chromatogrammes CPG/SM d'EMAG</i>		271
<i>Annexe 3 : Spectres de masse (EMAG, NAP)</i>		275
<i>Annexe 4 : Chromatogramme CPG/SM d'acides aminés</i>		280
<i>Annexe 5 : Temps de rétention en GPG/SM des esters N-trifluoroacétyl-isopropyliques d'acides aminés de référence</i>		281

# Abréviations

La liste des codes 3-lettres et 1-lettre correspondant aux acides aminés constitutifs des peptides décrits dans la 3<sup>ème</sup> partie sont donnés Tableau 3-1 page 141.

AG : Acide gras

AGC : Acide gras conjugué

AGI : Acide gras insaturé

AGDI : Acide gras diinsaturé

AGE : Acide gras essentiel

AGMI : Acide gras monoinsaturé

AGPI : Acide gras polyinsaturé

AGS : Acide gras saturé

AGT : Acides gras totaux

AL : Acide linoléique

ALA : Alpha-linolenic acid (acide  $\alpha$ -linoléique)

ALC : Acide linoléique conjugué

ALnC : Acide linoléique conjugué

ANC : Acide nonadécadiénoïque conjugué

ARA : Arachidonic acid (acide arachidonique)

ATP : Adénosine triphosphate

CCM : Chromatographie sur couche mince

CE<sub>50</sub> : Concentration efficace sur 50% des individus

CID : Collision induced dissociation (dissociation induite par collision)

CI<sub>50</sub> : Concentration inhibitrice de 50% des individus

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CMA : Concentration minimale active

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

2-OH-AG : Acide gras 2-hydroxylé

DHA : Docosahexaenoic acid (acide docosahexaénoïque)

DMA : Diméthyl acétal

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DCA : Dextrose - extrait de caséine - agar (milieu de culture)

DPA : Docosapentaenoic acid (acide docosapentaénoïque)

EM : Ester méthylique

EMAG : Ester méthylique d'acide gras

EPA : Eicosapentaenoic acid (acide eicosapentaénoïque)

ESI : Electrospray Ionization (ionisation par électrospray)

ESI-TI-SM : Spectrométrie de masse à trappe d'ions - ionisation par électrospray

GLA : Gamma-linolenic acid (acide  $\gamma$ -linoléique)

GLP : Glucose - levures - peptone (milieu de culture)

HDL : High density lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)

KM : Kohlmeyer modifié (milieu de culture)

KB : lignée cellulaire cancéreuse humaine

LCE : Longueur de chaîne équivalente

LDL : Light density lipoprotein (lipoprotéine de faible densité)  
MMS : Mycothèque Marine du SMAB  
MTT : bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium  
*m/z* : rapport masse sur charge  
NAP : *N*-Acyl pyrrolidide  
pds/pds : rapport poids à poids  
PL : Phospholipides  
SMAB : Substances Marines à Activité Biologique  
SM : Spectrométrie de masse  
SM<sup>n</sup> : fragmentation multiple en spectrométrie de masse  
TG : Triglycérides  
TI : Trappe d'ions  
UV : Ultraviolet  
v/v : volume à volume

# Liste des Figures

Figure 1-1 : Place des champignons dans la classification de Woese	6
Figure 1-2 : Carte des différents lieux de prélèvements	15
Figure 1-3 : Nombre total de colonies par genre identifié d'Ascomycètes	19
Figure 1-4 : Nombre moyen de colonies isolées par lieu	21
Figure 1-5 : Nombre moyen de colonies isolées par type de sédiments	22
Figure 1-6 : Variation saisonnière de la microfonge	23
Figure 1-7 : Morphologie des souches <i>Penicillium vermiculatum</i> et <i>Penicillium citreonigrum</i> cultivées sur milieu DCA	27
Figure 1-8 : Structures morphologiques du genre <i>Penicillium</i>	28
Figure 1-9 : Observation microscopique de <i>P. vermiculatum</i> (a) et <i>P. citreonigrum</i> (b) (coloration rouge Congo)	28
Figure 1-10 : Morphologie des souches <i>Trichoderma longibrachiatum</i> et <i>Trichoderma harzianum</i> cultivées sur milieu DCA	31
Figure 1-11 : Structures morphologiques du genre <i>Trichoderma</i>	32
Figure 1-12 : Observation microscopique de <i>T. longibrachiatum</i> MMS 151 (a) et <i>T. harzianum</i> MMS 752 (b) (coloration bleu coton)	32
Figure 2-1 : Formule générale d'un triglycéride	38
Figure 2-2 : Structure générale d'un phospholipide	39
Figure 2-3 : Schéma général de séparation des lipides en classes	54
Figure 2-4 : Réarrangement de Mac Lafferty engendrant le pic de base $m/z$ 74	57
Figure 2-5 : Réarrangement de Mac Lafferty engendrant le pic de base $m/z$ 113	58
Figure 2-6 : LCE des acides gras saturés et 2-hydroxysubstitués chez <i>T. longibrachiatum</i>	59
Figure 2-7 : Spectre de masse de l'EM de l'acide stéarique	60
Figure 2-8 : Spectres des EM des acides n-pentadécanoïque et anteiso-pentadécanoïque	61
Figure 2-9 : Spectre de l'EM d'un acide heptadécénoïque	62
Figure 2-10 : Spectre de masse du NAP de l'acide 9-heptadécénoïque	63
Figure 2-11 : Spectre de l'EM de l'acide linoléique	64
Figure 2-12 : Extrait d'un spectre de masse du NAP de l'acide linoléique	65
Figure 2-13 : Spectre de l'EM de l'acide 2-hydroxyoctadécénoïque	66
Figure 2-14 : Comparaison des chromatogrammes partiels de mélanges d'EM usuels et conjugués standards (Sigma, a) et d'EM d'origine fongique (lipides totaux de <i>T. longibrachiatum</i> , b)	67
Figure 2-15 : Comparaison des spectres des EM des acides $c_9, t_{11}/t_9, c_{11-18:2}$ commerciaux et de l'acide conjugué présentant une LCE de 18,12	69
Figure 2-16 : Comparaison des spectres des EM de l'acide $t_{10}, c_{12-18:2}$ commercial et de l'acide conjugué présentant une LCE de 18,20	70
Figure 2-17 : Spectre de masse du dérivé NAP du premier ALC (LCE = 18,11) élué après l'acide stéarique ( <i>P. vermiculatum</i> , AG des triglycérides)	71
Figure 2-18 : Spectre de masse CPG/SM de l'EM d'un acide linoléique conjugué	72
Figure 2-19 : Complexe formé entre l'ion $Ag^+$ et une double liaison	74
Figure 2-20 : Aspect huileux des lipides totaux de <i>P. citreonigrum</i>	78
Figure 2-21 : Spectre de l'EM de l'acide 2-hydroxyhexacosénoïque	81

Figure 2-22 : Spectre de masse de l'EM de l'acide octadécatriénoïque conjugué (LCE = 19,49)	82
Figure 2-23 : Spectre de masse de l'EM de l'acide triacontanoïque	84
Figure 2-24 : Spectre de masse de l'EM de l'acide dotriacontanoïque	86
Figure 2-25 : Spectre de masse du NAP de l'acide 9-nonadécénoïque (LCE = 18,83)	88
Figure 2-26 : Spectre de masse du NAP de l'acide 14-tétracosénoïque	90
Figure 2-27 : Chromatogramme CPG/SM partiel des TG de <i>Penicillium citreonigrum</i>	92
Figure 2-28 : Spectre de l'EM de l'acide hexadécadiénoïque conjugué	93
Figure 2-29 : Extrait du spectre de masse du dérivé NAP de l'acide hexadécadiénoïque	93
Figure 2-30 : Spectre de l'EM de l'acide 4-méthylhexadécénoïque	95
Figure 2-31 : Spectres des EM des isomères A, B et C de l'acide 4-Me-16:2	97
Figure 2-32 : Spectre de masse du NAP de l'isomère C de l'acide 4-Me-6,8-16:2	98
Figure 2-33 : Spectre du NAP de l'acide 4-Me-6,8-16:2 (LCE = 16,53)	99
Figure 2-34 : Spectre de l'EM de l'acide heptadécadiénoïque conjugué	100
Figure 2-35 : Spectre de l'EM de l'acide nonadécadiénoïque conjugué	101
Figure 2-36 : Courant ionique total des EMAG de <i>Penicillium citreonigrum</i> (triglycérides)	102
Figure 2-37 : Etapes successives d'inclusion dans l'urée permettant d'enrichir la fraction non incluse en acide 4-Me-6,8-16:2	103
Figure 2-38 : Courant ionique total des EMAG présents dans la fraction non incluse ④'	105
Figure 2-39 : Chromatogramme CLHP des EMAG de la fraction non incluse ④'	106
Figure 2-40 : Extrait du courant ionique total CPG de la fraction CLHP ②	107
Figure 2-41 : Contrôle par CPG/SM de la pureté de la fraction CLHP ②	108
Figure 2-42 : Cytotoxicité de l'acide 4-Me-6,8-16:2 après 24h de traitement sur myélome et gliome	109
Figure 2-43 : Cytotoxicité de l'acide 4-Me-6,8-16:2 après 24 et 48 h sur adénocarcinomes du colon	109
Figure 2-44 : Structure générale d'un plasmalogène	110
Figure 2-45 : Formation des diméthylacétals à partir des plasmalogènes	111
Figure 2-46 : Spectre de masse d'un diméthylacétal observé dans les EMAG de phospholipides ( <i>T. longibrachiatum</i> )	112
Figure 2-47 : Proportions relatives des classes lipidiques chez <i>T. longibrachiatum</i>	113
Figure 2-48 : Rendements de culture (a) et proportions lipidiques (b) des différents champignons étudiés	116
Figure 2-49 : Proportions relatives des classes lipidiques chez différents champignons étudiés	118
Figure 3-1 : Modèle de séquence-type des peptaïbols à 11 résidus	149
Figure 3-2 : Caractéristiques générales des peptaïbols à séquences courtes	151
Figure 3-3 : Modèle de séquence-type des peptaïbols à 20 résidus	153
Figure 3-4 : Modèle de séquence-type des peptaïbols à 18 résidus	156
Figure 3-5 : Modèles de perméabilité membranaire des peptides	158
Figure 3-6 : Modèle du changement conformationnel dépendant du potentiel	159
Figure 3-7 : Spectres de masse « Fullscan » et « Zoomscan » des trichobrachines (ESI <sup>+</sup> )	169
Figure 3-8 : Spectres de masse en mode Fullscan (a) et Zoomscan (b) de l'alaméthicine commerciale (ESI <sup>+</sup> )	170
Figure 3-9 : Nomenclature de la fragmentation peptidique	171
Figure 3-10 : Rupture préférentielle intervenant au niveau d'une liaison Aib-Pro	173
Figure 3-11 : Construction du graphe de filiation $b_n/a_n$ de l'ion $m/z$ 1183	176
Figure 3-12 : Graphe de filiation $y_n$ de l'ion $m/z$ 1183	177
Figure 3-13 : Graphe de filiation final $b_n a_n y_n$ de l'ion $m/z$ 1183	178
Figure 3-14 : Séquençage des peptaïbols longs en SM <sup>2</sup>	179
Figure 3-15 : Spectres de masse des esters N-trifluoracétyl isopropyliques de leucine et d'isoleucine	181

Figure 3-16 : CCM des fractions acétone de <i>T. longibrachiatum</i>	186
Figure 3-17 : CCM des fractions méthanol de <i>T. longibrachiatum</i>	187
Figure 3-18 : CLHP semi-préparative de la fraction TLA2-5	189
Figure 3-19 : Spectres d'ions totaux des fractions CLHP TLA3-1 à TLA3-6	190
Figure 3-20 : CLHP semi-préparative de la fraction TLA3-1	191
Figure 3-21 : Spectres d'ions totaux des fractions CLHP TLA4-1 à TLA4-13	193
Figure 3-22 : CLHP semi-préparative de la fraction TLM2-5	194
Figure 3-23 : Spectres d'ions totaux des fractions CLHP TLM3-1 à TLM3-5	195
Figure 3-24 : Synthèse des étapes d'obtention des peptaïbols produits par <i>T. longibrachiatum</i>	197
Figure 3-25 : CLHP de la fraction THA2-5	200
Figure 3-26 : Spectres d'ions totaux des fractions CLHP THA3-1 et THA3-2	201
Figure 3-27 : Spectre d'ions totaux de la fraction THM2-4	202
Figure 3-28 : Spectre d'ions totaux de la fraction THM2-5	202
Figure 3-29 : Synthèse des étapes d'obtention des peptaïbols à partir des extraits lipidiques de <i>T. harzianum</i>	203
Figure 3-30 : Graphe de filiation $b_n a_n y_n$ de l'ion $m/z$ 1155	204
Figure 3-31 : Graphe de filiation $b_n a_n y_n$ de l'ion $m/z$ 1169	205
Figure 3-32 : Graphe de filiation $b_n a_n y_n$ de l'ion $m/z$ 1183	206
Figure 3-33 : Graphe de filiation $b_n a_n y_n$ de l'ion $m/z$ 1197	207
Figure 3-34 : Graphe de filiation $b_n a_n y_n$ de l'ion $m/z$ 1211	207
Figure 3-35 : Graphe de filiation de l'ion $m/z$ 1141	209
Figure 3-36 : Partie microhétérogène commune à tous les peptides	209
Figure 3-37 : Différentes terminaisons C-terminales possibles à 2, 3 ou 4 résidus	210
Figure 3-38 : Graphe de filiation $b_n a_n y_n$ de l'ion $m/z$ 1197	211
Figure 3-39 : Graphe de filiation $b_n a_n y_n$ de l'ion $m/z$ 1211	212
Figure 3-40 : Graphe de filiation $b_n a_n y_n$ de l'ion $m/z$ 1225	212
Figure 3-41 : Ions $m/z$ 903 et 910 observés en mode Fullscan (fraction TLA4-1)	215
Figure 3-42 : Séquençage des ions $m/z$ 903 et 910 (fraction TLA4-1)	215
Figure 3-43 : Séquençage des peptaïbols à 20 résidus (fractions TLM3-1 à 5) par fragmentation $SM^2$ des ions adduits sodium bichargés et monochargés	217
Figure 3-44 : Spectre de masse de la fraction THM2-5	218
Figure 3-45 : Séquences des peptaïbols à 18 résidus (fraction THM2-5)	219
Figure 3-46 : Abondance (a) et rendement (b) relatifs du profil de répartition des peptaïbols courts selon le protocole utilisé	224
Figure 3-47 : Profils de répartition des peptaïbols à 11 résidus pour les deux souches étudiées	227
Figure 3-48 : Schéma général des séquences des peptaïbols à 11 résidus identifiés	228
Figure 3-49 : Caractéristiques des séquences de peptaïbols à 20 résidus des souches <i>T. longibrachiatum</i> et <i>T. harzianum</i>	232
Figure 3-50 : Caractéristiques des séquences de peptaïbols à 20 résidus des souches <i>T. longibrachiatum</i> et <i>T. harzianum</i>	233
Figure 3-51 : Relation entre la cytotoxicité sur cellules KB ( $1/CI_{50}$ ) et l'hydrophobie relative des peptaïbols courts microhétérogènes de <i>T. longibrachiatum</i> (fractions TLA3-2 à 6)	237

# Liste des Tableaux

Tableau 1-1: Colonies dénombrées pour chaque genre d'Ascomycètes identifié et par échantillon (pour 80 mg de sédiments)	18
Tableau 1-2: Taxonomie des espèces <i>Penicillium vermiculatum</i> et <i>Penicillium citreonigrum</i>	26
Tableau 1-3: Taxonomie des espèces <i>Trichoderma longibrachiatum</i> et <i>Trichoderma harzianum</i>	29
Tableau 2-1 : Principales sources d'acides gras essentiels	44
Tableau 2-2 : Acides gras essentiels d'origine fongique	49
Tableau 2-3 : Caractéristiques d'élution des ALC standards	68
Tableau 2-4 : Production lipidique de <i>T. longibrachiatum</i> à partir de cultures réalisées en milieu solide et liquide	77
Tableau 2-5 : Production lipidique de <i>T. harzianum</i> à partir de cultures réalisées en milieu solide	77
Tableau 2-6 : Production lipidique de <i>P. vermiculatum</i> à partir de cultures réalisées en milieu solide	78
Tableau 2-7 : Production lipidique de <i>P. citreonigrum</i> à partir de cultures réalisées en milieu solide	78
Tableau 2-8 : Composition en acides gras totaux et des phospholipides de <i>T. longibrachiatum</i> cultivé en milieu solide	80
Tableau 2-9 : Composition en acides gras totaux et des phospholipides de <i>T. longibrachiatum</i> cultivé en milieu liquide	83
Tableau 2-10 : Composition en acides gras totaux et des phospholipides de <i>T. harzianum</i>	85
Tableau 2-11 : Composition en acides gras des triglycérides et des phospholipides de <i>P. vermiculatum</i>	87
Tableau 2-12 : Composition en acides gras des triglycérides et des phospholipides de <i>P. citreonigrum</i>	91
Tableau 2-13 : Comparaison des différentes familles d'AG chez <i>T. longibrachiatum</i> à partir des cultures en milieu solide et liquide	114
Tableau 2-14 : Composition en AGS (% massiques)	120
Tableau 2-15 : Composition en acides gras monoinsaturés (% massiques)	122
Tableau 2-16 : Composition en acides gras diinsaturés non conjugués (% massiques)	125
Tableau 2-17 : Composition en acides gras 2-hydroxylés	127
Tableau 2-18 : Acides gras conjugués diinsaturés identifiés chez les 4 souches étudiées	129
Tableau 2-19 : Acides gras conjugués triinsaturés identifiés chez les 4 souches étudiées	131
Tableau 3-1 : Acides aminés entrant dans la composition des peptaïbols	141
Tableau 3-2 : Caractéristiques des sous-groupes de peptaïbiotiques	142
Tableau 3-3 : Principaux champignons producteurs de peptaïbols	144
Tableau 3-4 : Peptaïbols et autres peptaïbiotiques isolés des genres <i>Trichoderma</i> / <i>Hypocrea</i> (classés par nombre de séquences décrites par espèce)	147
Tableau 3-5 : Caractéristiques et variations structurales des peptaïbols à 11 résidus	149
Tableau 3-6 : Caractéristiques et variations structurales des peptaïbols à 12 résidus	150
Tableau 3-7 : Caractéristiques et variations structurales des peptaïbols à 13 résidus	150
Tableau 3-8 : Caractéristiques et variations structurales des peptaïbols à 14 résidus	151
Tableau 3-9 : Caractéristiques et variations structurales des peptaïbols à 20 résidus	153
Tableau 3-10 : Caractéristiques et variations structurales des peptaïbols à 19 résidus	154
Tableau 3-11 : Caractéristiques et variations structurales des peptaïbols à 18 résidus	156
Tableau 3-12 : Peptaïbols et autres peptaïbiotiques antibactériens	160
Tableau 3-13 : Peptaïbols et autres peptaïbiotiques antifongiques	162

Tableau 3-14 : Peptaïbols et autres peptaïbiotiques cytotoxiques	163
Tableau 3-15 : Toxicités larvaires des peptaïbols	164
Tableau 3-16 : Activités biologiques recensées pour les peptaïbols à courtes et longues séquences	165
Tableau 3-17 : Bilan massique et rendement de l'étape de CLHP préparative sur TLA2-5	189
Tableau 3-18 : Bilan massique et rendement de l'étape de CLHP sur la fraction TLA3-1	191
Tableau 3-19 : Bilan massique et rendement de l'étape 3 de séparation par CLHP préparative	195
Tableau 3-20 : Ions observés des peptaïbols présents dans les fractions CLHP TLM3-1 à TLM3-5	196
Tableau 3-21 : Culture et méthodes d'extraction/purification des peptaïbols	198
Tableau 3-22 : Etude comparative des milieux de culture, et des protocoles d'extraction et de purification des peptaïbols	199
Tableau 3-23 : Principaux ions observés dans les fractions TLA4-1 à TLA4-13	208
Tableau 3-24 : Séquences des peptaïbols à 11 résidus produits par <i>T. longibrachiatum</i> et <i>T. harzianum</i>	213
Tableau 3-25 : Séquences des peptaïbols à 18 résidus produits par <i>T. longibrachiatum</i> et <i>T. harzianum</i>	220
Tableau 3-26 : Séquences des peptaïbols à 20 résidus produits par <i>T. longibrachiatum</i>	220
Tableau 3-27 : Neurotoxicité des peptaïbols à 11 et 20 résidus sur larves de diptères	221
Tableau 3-28 : Résultat du test comportemental sur souris pour les trois peptaïbols testés	222
Tableau 3-29 : Evaluation de la cytotoxicité et des activités antimicrobiennes des peptaïbols	223
Tableau 3-30 Rendements de production des peptaïbols courts et longs chez les deux souches de <i>Trichoderma</i>	226
Tableau 3-31 : Composition en résidus variables et nombre total de séquences microhétérogènes théoriques des peptaïbols à 11 résidus de <i>T. longibrachiatum</i> et <i>T. harzianum</i>	228
Tableau 3-32 : Répartition des résidus variables aux positions 2, 3, 4, 7, 8 et 11 (amino alcool)	229
Tableau 3-33 : Terminaisons C-terminales possibles pour les peptides à 9 et 10 résidus produits par <i>T. longibrachiatum</i>	231
Tableau 3-34 : Abondance relative des peptaïbols produits par les deux souches (SM, Fullscan)	234
Tableau 3-35 : Bilan de l'étude pharmacologique des peptaïbols de <i>T. longibrachiatum</i>	236

## Liste des travaux réalisés au cours de ce travail

**Ruiz, N., Dubois, N., Wielgosz-Collin, G., Robiou du Pont, T., Bergé, J. P., Pouchus, Y. F. et Barnathan, G., 2007**

Lipid content and fatty acid composition of a marine-derived *Trichoderma longibrachiatum* strain cultured by agar surface and submerged fermentations.

Process Biochem., 42, 676-680.

**Poirier, L., Quiniou, F., Ruiz, N., Montagu, M., Amiard, J.C. et Pouchus, Y.F, 2007**

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

Aquatic. Toxicol., 83, 254-262.

**Ruiz, N., Wielgosz-Collin, G., Poirier, L., Grovel, O., Petit, K. E., Mohamed-Benkada, M., Robiou du Pont, T., Bisset, J., Verité, P., Barnathan, G., Pouchus, Y. F., 2007.**

New Trichobrachsins, 11-residue peptaibols from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*.

Peptides, sous presse ([doi:10.1016/j.peptides.2007.05.012](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.05.012)).

**Poirier, L., Amiard, J. C., Mondeguer, F., Quiniou, F., Ruiz, N., Pouchus, Y. F., Montagu, M., 2007**

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

J. Chromatogr. A, sous presse ([doi:10.1016/j.chroma.2007.04.006](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.006)).

### Participation à des congrès

**Poirier, L. Quiniou, F., Ruiz, N., Le Goff, M., Montagu, M. , Amiard, J. C, Pouchus, Y, F. 2006**

Evaluation de la toxicité des peptaïbols sur le développement embryonnaire de *Crassostrea gigas*.

Congrès de l'UOF, Nantes, 2-4 novembre 2006, communication orale.

**Ruiz, N., Dubois, N., Wielgosz-Collin, G., Pouchus, Y. F, Barnathan, G., 2006**

Détection d'acides gras conjugués chez des micromycètes marins par couplage chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse.

23ème JFSM, 11-14 septembre 2006, Nantes, communication par affiche.

**Poirier, L., Montagu, M., Amiard, J. C, Ruiz, N., Mondeguer, F., Pouchus, Y. F., 2006**

Peptaibols: toxic fungal metabolites in marine environment, development of a quantification method in marine sediments using LC/ESI-MS.

First International Symposium on Food, Veterinary and Medical Application of Antimicrobial peptides, Nantes, 21-23 juin 2006, communication orale.

**Ruiz, N., Honoré, A., Dubois, N., Wielgosz-Collin, G., Pouchus, Y. F, Barnathan, G., 2006**

Fatty acid composition of *Penicillium* sp., a microfungus isolated from marine sediments.

3ème congrès de lipidomique – GERLI- 10-12 Mai 2006, Marseille, communication par affiche.

**Ruiz, N., Poirier, L., Wielgosz-Collin, G., Mohamed-Benkada, M., Robiou du Pont, T., Montagu, M., Biard, J. F, Barnathan, G., Pouchus, Y. F, 2005**

Short peptaïbols: cytotoxic metabolites from a marine-derived strain of *Trichoderma longibrachiatum*.

4th European Conference on Marine Natural Products, 12-16 septembre 2005, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, communication orale.

# Introduction générale

# Introduction générale

---

Au début des années 1990, des phénomènes de toxicité inexplicée de coquillages ont été observés à divers endroits du littoral français. Les origines bactérienne, phytoplanctonique ou encore chimique (métaux lourds, hydrocarbures) ont été écartées. Le groupe SMAB « Substances Marines à Activité Biologique » proposa l'hypothèse d'une origine fongique de contamination des coquillages. En effet, les zones conchylicoles correspondant à des écosystèmes particulièrement riches en matière organique pourraient être considérées comme propices à l'implantation et au développement des moisissures saprotrophes et, ainsi, abriter une microfonge non négligeable potentiellement toxigène.

Afin de répondre à cette question, un programme de prélèvements d'échantillons provenant de différentes zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire a été entrepris, du traict du Croisic à la Prée, avec un échantillonnage de sédiments, d'eau de mer et de coquillages. Ces recherches avaient pour objectif de mettre en évidence la présence, au niveau des parcs conchylicoles de l'estuaire de la Loire, de souches fongiques productrices de mycotoxines qui auraient pu être bioaccumulées par les coquillages (Sallenave, 1999). Cette étude consistait, dans un premier temps, à montrer qu'une communauté fongique diversifiée était implantée au niveau des zones conchylicoles puis, dans un deuxième temps, de rechercher parmi les souches isolées, celles capables de produire des mycotoxines lorsqu'elles étaient cultivées sur des milieux réalisés à base d'eau de mer.

De nombreuses moisissures ont été isolées de ces échantillons, faisant ressortir quatre genres principaux : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* et *Cladosporium* (Sallenave-Namont *et al.*, 2000). Ces isolements ont également permis de rechercher, parmi toutes les souches isolées, celles qui présentaient des capacités toxigènes, en procédant à un criblage sur plusieurs tests biologiques. Un tiers des souches testées se sont avérées toxiques sur au moins un des tests, montrant ainsi le pouvoir toxigène non négligeable de la microfonge implantée dans ces zones. De plus, dans le but d'évaluer le risque pour le consommateur, des expériences de contamination artificielle de moules par des filtrats fongiques ont été réalisées et ont montré une accumulation possible des mycotoxines par les bivalves entraînant une toxicité des coquillages (Sallenave *et al.*, 1999; Landreau, 2001 ; Grovel, 2002).

A la suite de ce travail, et afin de mieux caractériser les mycotoxines responsables de ces toxicités, certaines souches toxigènes ont été cultivées au Laboratoire et leurs métabolites analysés. Ainsi, une souche marine d'*Aspergillus fumigatus*, champignon pathogène pour l'homme, a été étudiée pour sa production de gliotoxine en condition marine (Grovel, 2002) mais également des souches de *Trichoderma*, productrices de peptides neurotoxiques, les peptaïbols (Landreau, 2001; Mohamed-Benkada, 2006). Récemment, les peptaïbols ont été retrouvés pour la première fois dans des sédiments et des moules du Fier d'Ars qui présentaient une toxicité (Poirier *et al.*, 2007a). Ces travaux ont confirmé qu'il y a bien développement des moisissures en milieu marin et avec, par conséquent, un risque potentiel pour les coquillages et leurs consommateurs.

Les microorganismes des sédiments sont un maillon important de la chaîne alimentaire marine. Les micromycètes peuvent donc être considérés comme une source de métabolites disponibles pour leurs prédateurs. Les métabolites peuvent avoir des effets négatifs comme les toxines dont nous venons de parler ou correspondre à des éléments nutritifs importants pour leurs consommateurs.

C'est à partir de ces constats que débute le travail présenté dans ce mémoire, concernant l'étude de la biodiversité des micromycètes en zones conchylicoles ainsi que celles des métabolites qu'ils produisent en conditions marines de cultures.

Le travail présenté dans ce mémoire exposera successivement trois parties :

La première s'inscrit dans la suite des travaux menés au Laboratoire sur la connaissance des communautés fongiques de moisissures saprotrophes présentes en zones conchylicoles en s'intéressant cette fois à leur évolution spatio-temporelle. Dans cette partie nous présenterons les souches de micromycètes sélectionnées pour l'étude de leurs métabolites, exposée dans les deux autres parties, ainsi que les choix de procédés de cultures utilisés.

La deuxième partie concerne l'aspect positif que pourraient représenter les métabolites fongiques avec la production lipidique et l'étude de la composition en acides gras des champignons sélectionnés. Ces métabolites peuvent en effet jouer un rôle nutritif dans la chaîne alimentaire mais également être valorisés en nutrition humaine après production par biotechnologies. De plus, une approche de type fondamental a été menée sur la composition des acides gras des phospholipides, c'est-à-dire les éléments de base de la structure des membranes cellulaires. La méthodologie employée, les résultats obtenus en terme de bioproduction et de composition en acides gras sont discutés et comparés pour quatre souches fongiques : deux *Penicillium* sp. et deux *Trichoderma* sp.

La dernière partie s'intéresse, cette fois, à l'aspect négatif que peuvent représenter des métabolites fongiques avec la recherche de toxines appartenant à la famille des peptaïbols à partir des mêmes cultures que celles utilisées pour l'étude lipidique sur les deux souches de *Trichoderma*. Les résultats obtenus sont comparés aux travaux précédemment réalisés au Laboratoire. L'intérêt de l'étude de ces peptides dans un but chimiotaxonomique est également envisagé. Enfin, la toxicité, les activités antimicrobienne et cytotoxique sont discutées.

Un des objectifs de ces travaux est d'approfondir les savoirs sur les peptaïbols et d'ouvrir un nouveau champ de connaissance, s'agissant des lipides et acides gras de micromycètes marins.

## Partie 1

Microfonge saprotrophe des  
zones conchylicoles : étude et  
évolution, sélection de souches,  
mise en culture

# Partie 1- Microfonge saprotrophe des zones conchylicoles : étude et évolution, sélection de souches, mise en culture

---

Afin d'étudier la production de métabolites par des moisissures issues du milieu marin, nous allons présenter l'étude mycologique qui a conduit à la sélection des souches étudiées. Cette étude s'inscrivait dans la suite des travaux menés au Laboratoire sur la connaissance des communautés fongiques de moisissures saprotrophes présentes en zone conchylicoles. Lors de la première étude, le but avait été la mise en évidence de la présence de souches toxigènes dans ces zones. Cette fois, c'est l'évolution spatio-temporelle des communautés qui est étudiée.

Nous présenterons cette étude après avoir rappelé ce qu'est la microfonge marine par une revue bibliographique.

# P1-I- Champignons et écosystèmes marins - étude bibliographique

De nombreux isollements de champignons à partir du milieu marin ont été réalisés au cours des cinquante dernières années. La raison principale de cet engouement est sans aucun doute le fait que cette microfonge marine ait un rôle écologique important largement sous-estimé (Hyde *et al.*, 1998) (Jones, 1998).

De plus, qu'ils soient strictement marins ou non, ces organismes représentent un réservoir non négligeable de substances à activités toxiques (Sallenave-Namont *et al.*, 2000) (Sallenave *et al.*, 1999) ou à visées pharmacologique et médicale (Christophersen *et al.*, 1999) (Sponga *et al.*, 1999). En 1998, le nombre total de champignons en milieu marin était estimé à 72000 dont 500 à 1500 environ à des espèces strictement marines (Jones, 1998).

Cette synthèse bibliographique rappellera brièvement définition et classification actuelle des champignons avant de s'intéresser plus spécifiquement aux champignons marins et aux espèces saprotrophes répandues dans l'environnement marin.

## I-1- Les champignons : définition générale

Les champignons, encore appelés Mycètes ou *Fungi* ne constituent pas un groupe homogène. Néanmoins ce sont tous des organismes eucaryotes, dont la nutrition est caractérisée par l'absorption, le long de leur paroi, des nutriments qu'ils puisent dans leur environnement sous forme dissoute. Ce mode de nutrition oblige les champignons à posséder des enzymes complexes et variées, propres à réaliser la dégradation et l'assimilation des sources nutritives. Cette puissante activité enzymatique a pour conséquence d'engendrer une multitude de métabolites et de produits de dégradation. Ainsi, les champignons, grâce à leur extraordinaire pouvoir de sécrétion de métabolites et leur capacité à transformer et améliorer des produits existants, sont très largement étudiés aussi bien en recherche fondamentale qu'en recherche appliquée et intéressent les grands secteurs industriels, pharmaceutique et agro-alimentaire (Bouchet *et al.*, 2005).

Contrairement aux végétaux, ils ne possèdent pas de chloroplastes, et sont donc des organismes hétérotrophes vis-à-vis du carbone. Leur nutrition carbonée dépend donc de la présence de matières organiques produites par d'autres organismes, ce qui les rapproche du règne animal. Nombre d'entre eux ont des parois renforcées par de la chitine ce qui est un caractère animal.

Cependant, ils se rapprochent également des végétaux par l'existence d'une paroi cellulaire périphérique et de vacuoles turgescents dans le cytoplasme. Ils ont longtemps été regroupés avec les Thallophytes, car constitués de filaments végétatifs au même titre que les thalles des algues. Les champignons ont définitivement été séparés des végétaux avec la classification de Whittaker qui les situa entre les Règnes végétal et animal (Whittaker, 1969). A l'heure actuelle, les champignons sont regroupés dans le règne des Eucaryotes dans le modèle ternaire de Woese.

Leur nombre est actuellement estimé approximativement à un million d'espèces.

## I-2- Classification des champignons

Avec la classification ternaire de Woese il a été clairement admis que les champignons correspondent à un groupe polyphylétique assez complexe pouvant être divisé en trois grands groupes : les champignons-animaux ou Mycétozoaires, les Champignons-algues et les champignons « vrais » ou Eumycota (Bouchet *et al.*, 2005) (Figure 1-1).

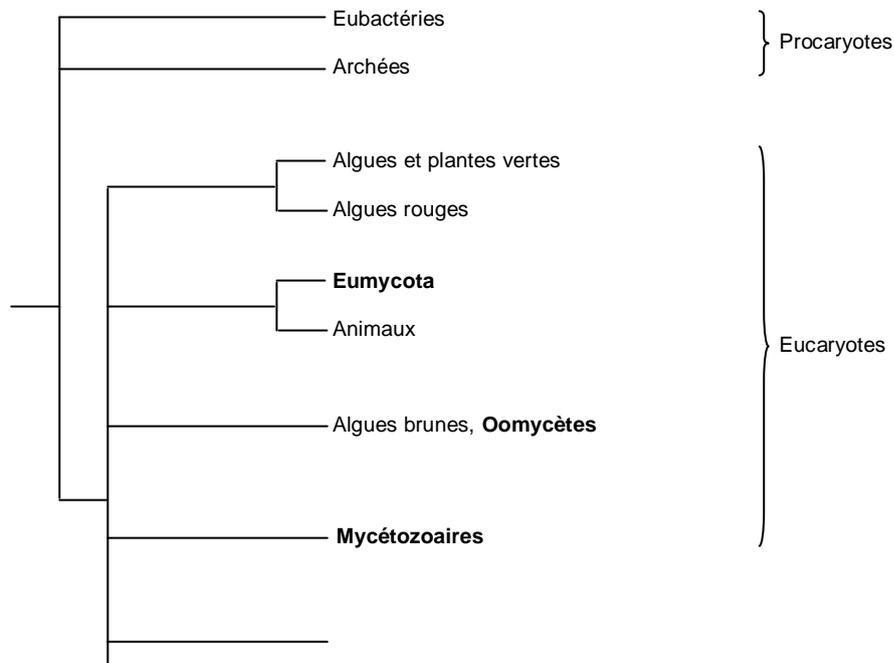


Figure 1-1 : Place des champignons dans la classification de Woese

### I-2-1- Les Mycétozoaires

Les Mycétozoaires, champignons amiboïdes montrent très peu de ressemblance avec les autres mycètes. Ils regroupent les classes des Myxomycètes, Acrasiomycètes et Plasmodiophoromycètes.

Les Myxomycètes, autrefois non regroupés dans les Mycétozoaires, étaient appelés champignons animaux. En effet, caractérisés par un plasmode plurinucléé, ils peuvent se déplacer grâce à leurs pseudopodes, qui leur servent également de moyen de nutrition sur les végétaux en décomposition. Leur mode de nutrition est analogue à celui des amibes, par ingestion de petites particules alimentaires. La biologie moléculaire a permis d'associer aux Myxomycètes, majoritaires, les Acrasiomycètes et les Plasmodiophoromycètes, moins abondants.

Les Acrasiomycètes ne présentent pas de cellules flagellées ni de plasmodes mais s'organisent en structure cellulaire, on parle de myxamibes ou de pseudo-plasmodes. Enfin, les Plasmodiophoromycètes sont des parasites, notamment des végétaux, qui peuvent présenter au cours de leur cycle parasite plusieurs formes : plasmode plurinucléé microscopique, spores flagellées mono et binucléées.

## I-2-2- Les champignons-algues

Ce sont des champignons, en partie, aquatiques du fait qu'ils possèdent au moins un stade flagellé dans leur cycle de reproduction. Les Oomycètes en constituent la classe principale. Ils ne sont plus vraiment considérés à l'heure actuelle comme des champignons bien qu'ils présentent un mode de vie typiquement fongique.

Ils se rapprochent des végétaux par leur paroi principalement constituée de cellulose. Autrefois, regroupés dans les Mastigomycota avec les Chytridiomycètes, ils étaient considérés comme des champignons inférieurs du fait de leur appareil végétatif, constitué de filaments non cloisonnés par opposition aux champignons supérieurs.

Aujourd'hui complètement reconsidérés, ils sont inclus dans le grand groupe très diversifié des Hétérochontes regroupant d'autres « champignons inférieurs », les Hyphochytridiomycètes et les Labyrinthulidomycètes mais aussi des organismes photosynthétiques comme les algues brunes et les Diatomées.

Remarque : De nombreuses publications étant basées sur l'ancienne classification, les termes Mastigomycota, Oomycètes et Chytridiomycètes pourront être employés dans la suite du manuscrit. Toutefois dans ce cas, une correspondance avec la nouvelle classification sera précisée.

## I-2-3- Les Eumycètes

Les champignons « vrais » ou Eumycota (« Eumycètes »), sont un groupe frère des champignons-animaux et se rapprochent du règne animal, notamment par des caractéristiques telles qu'une paroi exclusivement constituée de chitine.

Autrefois appelés Amastigomycota, ils regroupaient tous les champignons ne présentant aucun stade flagellé dans leur cycle de reproduction, contrairement aux Mastigomycota. Les Eumycètes regroupent ainsi les champignons inférieurs, les Zygomycotina (« Zygomycètes ») et les champignons supérieurs, les Ascomycotina (« Ascomycètes ») et les Basidiomycotina (« Basidiomycètes »).

Avec la nouvelle classification, les Chytridiomycètes, qui formaient avec les Oomycètes les Mastigomycota (présentant un stade flagellé), sont aujourd'hui regroupés dans les Eumycètes en tant que champignons archaïques qui auraient gardés leurs cellules flagellées.

La distinction entre Zygomycètes, Ascomycètes et Basidiomycètes dépend principalement de leur mode de reproduction sexuée produisant respectivement des zygotes, des asques ou des basides.

Les Zygomycètes sont des champignons inférieurs, contrairement aux Ascomycètes et Basidiomycètes car ils présentent des filaments mycéliens non cloisonnés.

Les Ascomycètes et les Basidiomycètes correspondent aux champignons les plus évolués. Le cloisonnement mycélien permet en effet l'acquisition d'une caryophase et la réalisation de pseudotissus, les plectemchymes qui sont à l'origine de la formation de structures macroscopiques : les sporophores, chez les espèces les plus évoluées.

Certains champignons supérieurs ne sont connus que sous leur forme anamorphe, c'est-à-dire, leur forme de multiplication végétative et ont été de ce fait regroupés dans le groupe des Deutéromycètes.

Néanmoins ce groupe de champignons tend à disparaître. En effet, avec l'avènement de la biologie moléculaire, de plus en plus de formes sexuées des Ascomycètes sont associées aux formes anamorphes des Deutéromycètes dont elles sont les téléomorphes.

Remarque : Comme précédemment, du fait que de nombreuses publications sont basées sur l'ancienne classification, nous considérerons principalement les Zygomycètes, Ascomycètes et Basidiomycètes comme classes des Eumycètes.

### I-3- La notion de « champignons marins »

Les premières espèces de champignons isolées du milieu marin - *Phaeosphira typharum* et *Sphaeria oceanica* - ont été décrites respectivement par Desmazières en 1849 et par Durieu de Maisonneuve et Montagne en 1869 (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979). En 1934, Sparrow (1934) montre l'existence de champignons saprotrophes dans l'environnement marin.

Mais c'est à partir de 1944, grâce aux travaux de Barghoorn et Linder, que la mycologie marine prend un réel essor avec la publication de nombreuses espèces. En effet, ils arrivent à mettre en évidence la croissance et la reproduction de champignons marins sur des substrats naturels tel que du bois, immergés dans de l'eau de mer.

Cette découverte déclencha une vaste campagne de collecte de champignons dans toutes les régions du globe, qui se poursuit encore ; mais c'est dans les années 1960-70 que le plus grand nombre d'espèces marines furent décrites.

Pourtant, admettre l'existence de champignons marins ayant un rôle dans la décomposition de la matière organique ne fut pas aisée. De nombreux chercheurs, comme Bauch (1936), réfutaient cette affirmation. La définition de tels champignons en fut d'autant plus difficile et ambitieuse.

En 1959, Gold (1959) proposa une première définition basée uniquement sur les critères physiologiques : tout champignon est considéré comme « marin » si la salinité est nécessaire pour obtenir un optimum de croissance et la reproduction du champignon. Cette définition a été reprise par Kohlmeyer (1963) qui proposa de considérer un champignon comme « marin » s'il peut se développer et se reproduire en milieu marin, excluant ainsi toutes les souches se développant en milieu terrestre et dont les spores se retrouvent en milieu marin sans s'y développer.

Une définition basée uniquement sur des critères physiologiques semblant néanmoins trop restrictive, cette dernière a été reconsidérée en intégrant des critères écologiques (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979). Selon les auteurs, deux groupes de champignons peuvent être distingués :

- les champignons **marins obligatoires**, se développant et sporulant exclusivement dans les environnements marins ou estuariens
- les champignons **marins facultatifs**, provenant des eaux douces ou du milieu terrestre, qui sont capables de se développer et éventuellement de sporuler en milieu marin

Cette nouvelle définition a été rediscutée lors du V<sup>ème</sup> Symposium International de Mycologie Marine où il a été considéré qu'une quantité importante de champignons n'avait pas été prise en compte du fait

de critères trop sélectifs (Hughes, 1992). Il a alors été postulé que les champignons « marins » formeraient un groupe beaucoup plus large et qu'il faudrait également considérer l'activité et le rôle des champignons terrestres adaptés aux écosystèmes côtiers et marins et qui n'ont pas nécessairement besoin de se développer ou de sporuler dans le milieu marin pour avoir une incidence ou jouer un rôle important.

En 1997, Fenical et Jensen sont revenus sur les critères physiologiques et écologiques en considérant que le besoin en sel ne devrait pas être un critère fondamental, compte tenu des capacités d'adaptation de ces champignons à tous les milieux, mais qu'il fallait plutôt considérer la capacité de reproduction en milieu marin.

Toutes ces définitions successives évoquent la difficulté de définir correctement les champignons marins. Faut-il considérer uniquement leurs critères de développement et de reproduction en milieu marin, ou leur rôle écologique ? Actuellement, les auteurs s'accordent pour distinguer les champignons strictement marins des champignons marins facultatifs, suivant la définition proposée par Kohlmeyer et Kohlmeyer (1979).

## I-4- Les champignons en milieu marin

### I-4-1- Adaptation au milieu

Kohlmeyer (1963) considère que la plupart des champignons rencontrés dans le milieu marin sont très adaptables en ce qui concerne leur physiologie, et peuvent vivre aussi bien en eau marine que douce. Le terme de champignon marin ne signifie donc pas qu'il y ait exclusivement développement dans les eaux marines, et la distinction entre mycologie marine et aquatique est d'autant plus difficile à définir.

La forte adaptabilité des champignons aux conditions salines fait que pour certains d'entre eux, la salinité peut devenir un facteur limitant, avec un ralentissement de la croissance lorsque la concentration en sel diminue. De plus, certains champignons ont montré une complète inhibition de leur développement sur des milieux appauvris en eau salée.

Une autre forme d'adaptation des champignons aux conditions marines est la possibilité de maintenir des pressions osmotiques importantes en équilibre en accumulant des sucres comme le mannitol et l'arabitol dans leurs cellules (Jones, 1988). L'isolement de champignons dans des échantillons d'eau de surface de la mer Morte (Buchalo *et al.*, 1998; Kis-Papo *et al.*, 2001; Kis-Papo *et al.*, 2003) et d'eau salée de marais salants de la côte nord adriatique (Gunde-Cimerman *et al.*, 2001; Butinar *et al.*, 2005) montre l'importante capacité d'adaptation de ces microorganismes aux conditions salines extrêmes.

L'isolement de champignons extrémophiles au niveau des régions polaires arctique (Gunde-Cimerman *et al.*, 2003) et antarctique (Del Frate et Caretta, 1990; Grasso *et al.*, 1997) montre également leur fort potentiel d'adaptation aux conditions extrêmes.

## I-4-2- Relations trophiques

On retrouve en milieu marin les trois types d'interactions présentes en milieu terrestre : saprotrophisme, parasitisme et symbiose.

### I-4-2-1- Saprotrophisme

La majorité de la microfonge d'origine marine vit en saprotrophe, et joue un rôle important dans la dégradation de la matière organique, qu'elle provienne de végétaux marins (algues, mangroves), de débris de bois déposés par la marée ou d'animaux morts (coquillages, crustacés, poissons).

Les mycologues ont ainsi isolé des champignons marins obligatoires et facultatifs à partir de tous types de prélèvement : sédiments côtiers, eau et écume de mer, bois dérivants, racines de végétaux, en utilisant différentes méthodes d'isolement (culture sur boîte en milieu enrichi, culture avec substrat naturel).

Ces recherches ont montré que la plupart des champignons isolés avaient un rôle non négligeable dans la minéralisation de la matière organique et étaient capables d'utiliser les substrats naturels présents dans leur environnement immédiat.

### I-4-2-2- Parasitisme

Beaucoup de champignons ont un mode de vie parasite, et survivent aux dépens des organismes hôtes les abritant. Il existe dans l'environnement marin des champignons parasites de plantes aquatiques ou encore d'algues. C'est le cas de *Cytospora rhizosphorae* ou de *Lulworthia* sp., qui sont des champignons intertidaux parasites des racines de *Rhizophorae* sp. et autres végétaux de mangroves (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979) ou encore *Mycaurroela dilsea*, Basidiomycète provoquant des nécroses au niveau des feuilles de *Dilsea carnososa* (Stanley, 1992).

### I-4-2-3- Symbiose

Les champignons sont capables de réaliser des associations symbiotiques à bénéfice réciproque avec d'autres organismes. Certains champignons forment des associations symbiotiques lichénoïdes avec les algues. En effet, de nombreux lichens se développent sur les rochers dans les zones intertidales, immergées durant la haute mer (Hyde *et al.*, 1998).

D'autres champignons forment des associations mutualistes avec des macroalgues appelées mycophycobioses (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979). C'est le cas de *Mycosphaerella ascophylli*, champignon endophyte obligatoire de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* (Stanley, 1992). Il existe également comme en milieu terrestre, des mycorhizes, associant champignons et plantes halophytes, indispensables pour la résistance du végétal aux conditions salines (Khan et Belik, 1995).

### I-4-3- Les champignons saprotrophes isolés du milieu marin

La microfonge saprotrophe est très répandue dans l'environnement marin et particulièrement au niveau des sédiments où de nombreux champignons ont été décrits : lignicoles, kératynicoles, calcicoles.

#### I-4-3-1- Champignons arénicoles

Les champignons arénicoles occupent une place importante dans l'environnement marin et jouent un rôle essentiel dans la chaîne alimentaire. En effet, ces organismes se développant au niveau des sédiments côtiers dans les interstices des grains de sable participent ainsi à la reminéralisation des nutriments présents dans leur environnement.

En effet, du fait de leur fort potentiel enzymatique, les champignons sont capables de dégrader cellulose, alginates, agar, kératine, substrats calciques. Beaucoup d'espèces fongiques décrites sont définies comme étant arénicoles. *Corollospora maritima* se développe sur les grains de sable en utilisant différents substrats naturels présents dans son environnement immédiat. C'est un champignon ubiquiste très largement répandu dans les écosystèmes côtiers (Nakagiri *et al.*, 1999) aussi bien en régions tempérées - Danemark (Rees *et al.*, 1979; Rees et Jones, 1985), Japon (Tokura, 1982; Tokura, 1984) - qu'en régions tropicales - Mexique (González *et al.*, 1998), Floride (Wagner-Merner, 1972).

Nakagiri *et al.* (1999) étudièrent la distribution géographique de la microfonge marine sur une période de deux années au niveau de la côte pacifique japonaise. Ils remarquèrent une distribution géographique et saisonnière des champignons arénicoles influencée par la température de l'eau : certaines espèces étaient présentes sur tous les sites de la zone d'étude, à chaque saison comme *Corollospora maritima* ou *Arenariomyces trifurcatus*, tandis que d'autres, uniquement présentes au nord ou au sud de la zone, avaient une distribution géographique qui variait en fonction des saisons. Ces travaux ont apporté beaucoup d'informations sur la distribution de chaque espèce présente sur les côtes.

#### I-4-3-2- Champignons dégradant les substrats végétaux

Les champignons sont pour la majorité des décomposeurs et leur importance en milieu marin dépend de leur capacité à dégrader la lignine ou la cellulose (Hyde *et al.*, 1998). Ainsi de nombreux chercheurs ont isolé des champignons décomposant des substrats naturels (débris de végétaux, d'algues, de bois dérivant ou encore de feuilles, déposés à chaque marée) confirmant les travaux de Barghoorn et Linder (1944), avec l'observation d'espèces lignicoles comme *Corollospora maritima*, *Halosphaeria quadricornuta*, *Lulworthia* sp.

De nombreux travaux relatifs à la dégradation de substrats végétaux par la microfonge marine ont été réalisés dans différentes zones géographiques, en régions tempérées et tropicales, montrant une spécificité géographique plus ou moins marquée de certaines espèces.

Des travaux en zones tempérées ont mis en évidence des champignons caractéristiques comme *Lulworthia* sp., *Ceriosporopsis halima*, *Arenariomyces trifurcatus* (Jones *et al.*, 1999; Koch, 1996 #23}. Petersen et Koch (1997) ont étudié la distribution verticale des champignons lignicoles sur des poteaux en bois de chêne et de mélèze d'un port de plaisance du Danemark. Ils ont ainsi montré que certains champignons étaient caractéristiques de la zone étudiée : immergée (*Halosphaeria appendiculata*), intertidale (*Lulworthia fucicola*) et émergée (*Leptosphaeria pelagica*) contrairement à d'autres dont la

présence était indépendante de la zone (*Cirrenalia macrocephala*). Ces recherches ont également montré une spécificité de substrat de la microfonge isolée. En effet, les bois durs comme le chêne étaient plus sujets aux colonisations fongiques que les bois souples comme le mélèze.

Plusieurs recherches sur les mangroves des régions tropicales ont montré le développement et la présence de champignons au niveau des racines et des branches collectées. C'est le cas de *Leptosphaeria australiensis*, *Peuconia prolifica*, ou *Halosphaeria quadricornuta*, qui sont considérés comme des champignons lignicoles caractéristiques de ces régions (El-Sharouny *et al.*, 1998).

En effet, lors de l'étude de la microfonge de mangroves de la côte est Sud-africaine, Steinke et Jones (1993) ont observé que la majorité des champignons décrits étaient spécifiques des régions tropicales avec une distribution géographique influencée par les courants océaniques. Plus récemment, Abdel-Wahab (2005) a montré que la diversité fongique au niveau de mangroves de la mer Rouge était plus caractéristique de mangroves subtropicales que tropicales. Il a également été démontré que la richesse spécifique des champignons variait en fonction des saisons. La diversité fongique observée au niveau des palmiers d'eau (*Nypa fructicans*) des mangroves thaïlandaises était plus importante en périodes humides qu'en périodes sèches (Pilantanapak *et al.*, 2005).

Les champignons lignicoles occupent une place importante dans l'écosystème que constituent les mangroves. Kohlmeier (1995) montra que la colonisation primaire par la microfonge marine des branches et racines de mangroves était primordiale et essentielle pour la fixation des larves de bivalves, intervenant dans la détérioration du bois.

De nombreuses recherches ont porté sur l'écologie des champignons lignicoles. Les travaux de Poonyth *et al.* (2001) avaient pour objectif l'étude de la colonisation par la microfonge de bois de mangroves immergés dans des zones intertidales. Cette étude s'est déroulée durant une longue période (78 semaines) et a démontré une variabilité dans la colonisation temporelle du substrat : se distinguaient ainsi les champignons présents durant toute la durée de l'étude (*Periconia prolifica*) de ceux se développant au début (*Cumulospora maritima*), au milieu (*Lignicola laevis*) ou en fin d'expérience (*Dactylospora haliotrepha*).

Ainsi les champignons marins lignicoles ont une réelle capacité de dégradation de molécules organiques complexes, telles que la lignine ou la cellulose, capacité représentant une contribution majeure à la qualité de l'environnement et au maintien de la biodiversité (Jones, 1998).

### I-4-3-3- Champignons dégradant les substrats animaux

Certains champignons présents dans les écosystèmes marins arrivent à se développer en dégradant la kératine contenue dans certains substrats animaux.

Lors de travaux réalisés en Antarctique (terre Victoria), Del Frate et Caretta (1990) ont isolé de plumes d'oiseaux des espèces comme *Chrysosporium vernicosum* et *Phoma herborum*. En 1998, Ananda nota la présence de *Corollospora angusta* au niveau de plumes accumulées sur les plages sableuses de la côte ouest de l'Inde, et montra ainsi que des substrats animaux constitués de kératine pouvaient être potentiellement utilisés par des champignons marins comme source nutritive.

En 2000, l'équipe de González a isolé des champignons marins de trois plages du Mexique en incubant des échantillons de sable avec des cheveux (technique hair-baiting). Les champignons les plus fréquemment isolés n'étaient pas particulièrement connus comme décomposeurs de la kératine : *Gymnascella dankaliensis* est plutôt une espèce coprophage et *Aspergillus terreus* une moisissure

saprotrophe (Ascomycètes). *Arthroderma curreyi*, espèce kératinolytique, était beaucoup moins fréquente dans cette étude.

Ces résultats suggèrent que les champignons présents dans les écosystèmes côtiers arrivent à coloniser des substrats kératinisés et corroborent ainsi les travaux publiés par Ananda.

Ananda (1998) observa également des développements fongiques sur des substrats calcaires : résidus d'exosquelette de crabe, d'arêtes de poisson, et de coquilles. Une prédominance de champignons arénicoles comme *Corollospora maritima* ou *C. angusta* était observée au niveau des arêtes de poisson.

Ces travaux soulignent le fait que cette matière organique, importante en milieu marin, puisse servir de source nutritive pour la croissance des champignons marins.

D'une manière plus générale, l'ensemble de ces résultats montrent la capacité des champignons marins à exploiter les ressources organiques disponibles dans les substrats animaux. Les différentes études réalisées en mycologie marine ont fait ressortir l'importance et le rôle des champignons au niveau des écosystèmes marins.

## I-5- Les moisissures terrestres en milieu marin

D'autres saprotrophes, les moisissures terrestres, sont fréquemment isolées du milieu marin. Cependant, leur rôle reste encore très discuté et peu reconnu par la communauté scientifique. En effet, la plupart des scientifiques considèrent que les moisissures ne sont présentes dans les écosystèmes marins qu'à l'état de spores.

Même si la majorité des travaux ne concerne que des champignons répondant aux critères proposés par Kohlmeyer (1979), les recherches se poursuivent sur les moisissures dans le but de prouver qu'elles sont capables de se développer et de jouer un rôle dans les écosystèmes marins.

Les champignons filamenteux sont connus depuis longtemps en milieu marin. Plusieurs espèces ont été isolées d'eaux côtières hawaïennes en utilisant une méthode de culture sur boîte (Wright Steele, 1967). Les écosystèmes étudiés ont montré une abondance et une variation des populations fongiques en fonction des zones. L'auteur discuta les critères définissant les champignons marins en évoquant la difficulté de considérer les moisissures comme espèces marines, même si des études antérieures relataient une meilleure croissance de champignons filamenteux d'origine terrestre sur des milieux de culture salés (Gray *et al.*, 1963).

Des études plus récentes ont été publiées sur les champignons filamenteux. González *et al.* (1998) ont étudié l'abondance et la diversité de la microfonge arénicole de trois plages mexicaines. Les résultats obtenus ont montré une prédominance de l'espèce non marine *Cladosporium cladosporioides* sur les trois sites étudiés. La majorité de la microfonge présente dans les sédiments intertidaux était constituée de champignons non marins, en accord avec des travaux antérieurs réalisés au Danemark (Rees et Jones, 1985) et en Espagne (Genilloud *et al.*, 1994). Les auteurs insistèrent sur le fait que les moisissures décrites, par l'influence de facteurs écologiques, pourraient devenir actives et alors être considérées comme des espèces marines facultatives. Les auteurs concluent également que l'abondance des moisissures décrites pourrait être liée aux processus de minéralisation et de recyclage des nutriments.

De même, une étude de la microfonge d'une plage de Rio de Janeiro (Brésil) a révélé la présence de champignons filamenteux appartenant majoritairement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*,

montrant ainsi que les écosystèmes côtiers représentent un vaste réservoir fongique (de Moura Sarquis et de Oliveira, 1996).

Les travaux de Shaumann (1993) ont relaté la présence de moisissures en mer du Nord et en Atlantique nord. Les prélèvements de sédiments et d'eau de mer ont été effectués en haute mer, aux profondeurs sublittorale et abyssale. Les résultats obtenus indiquent que l'abondance et la diversité de la microfonge varient avec la profondeur mais dépendent également d'autres paramètres comme la nature du sol, la concentration en oxygène ou les courants. Les zones de faibles remous, par exemple, présentent de plus fortes densités fongiques liées à une accumulation de matière organique dans les sédiments.

Enfin, la mise en évidence de peptaïbols dans les sédiments d'Ars-en-Ré et l'isolement des *Trichoderma* sp. les produisant a prouvé que les moisissures présentes en milieu marin peuvent s'y développer (Poirier *et al.*, 2007a).

Ces publications ont ainsi montré que des moisissures connues en milieu terrestre sont présentes en milieu marin et auraient un rôle écologique non négligeable dans ces écosystèmes.

Des publications plus récentes corroborent les résultats précédents. La première concerne la recherche de métabolites bioactifs de champignons isolés des sédiments de plages japonaises. Les champignons prédominants sont ceux appartenant aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Trichoderma* (Khudyakova *et al.*, 2000). La seconde, s'intéressant à la présence des champignons dans les eaux côtières du nord de la Grèce a montré également une prédominance de souches du genre *Penicillium*, *Aspergillus* et *Alternaria* (Arvanitidou *et al.*, 2002). Enfin, en 2003, des recensements de champignons filamenteux au niveau de sédiments estuariens de la région de Cubatão (état de Sao Paulo, Brésil), plus ou moins pollués par des hydrocarbures polycycliques aromatiques, ont montré une prédominance d'Ascomycètes de forme anamorphe incluant les genres *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* et *Trichoderma* (da Silva *et al.*).

Tous ces travaux sont en adéquation et montrent bien la relation entre la présence de ces champignons et le processus de dégradation de la matière organique, qu'elle soit naturelle ou d'origine industrielle. Ces similitudes dans des lieux et des prélèvements différents pourraient représenter ainsi un argument supplémentaire de l'implantation des moisissures en milieu marin. Néanmoins, la mise en évidence de métabolites fongiques, propres aux moisissures, dans des échantillons provenant du milieu marin (sédiments, coquillages...) est la preuve confirmant d'une part, le développement et d'autre part, le rôle des moisissures en milieu marin.

Les travaux de recensement de la microfonge présente au niveau des parcs conchylicoles de l'estuaire de la Loire, poursuivis par le Laboratoire ont mis en évidence l'implantation des moisissures dans ces zones. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre suivant.

## P1-II- Etude de la microfonge saprotrophe

Au cours de la période 2001-2003, des prélèvements réguliers de sédiments ont été réalisés afin d'étudier l'évolution sur un moyen terme de la microfonge présente au niveau des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire. Des sites de Loire-Atlantique et de Vendée présentant des caractéristiques différentes, au niveau topographique et au niveau des coquillages présents (cultivés ou en gisement), ont ainsi été retenus. Suite à ces travaux, des souches fongiques représentatives de la microfonge saprotrophe ont été sélectionnées pour l'étude de leurs métabolites d'intérêt nutritionnel et structural (lipides, acides gras) ou toxiques (peptides). Nous présenterons donc dans ce chapitre tout d'abord l'étude spatio-temporelle de l'évolution de la microfonge saprotrophe des zones étudiées puis nous décrirons les souches sélectionnées pour les études pharmacochimiques ainsi que leurs conditions de culture.

### II-1- Prélèvements, échantillonnage et isolements des champignons

#### II-1-1- Description des sites

Cinq sites appartenant à trois zones distinctes ont été choisis du nord au sud de l'estuaire de la Loire (Figure 1-2).

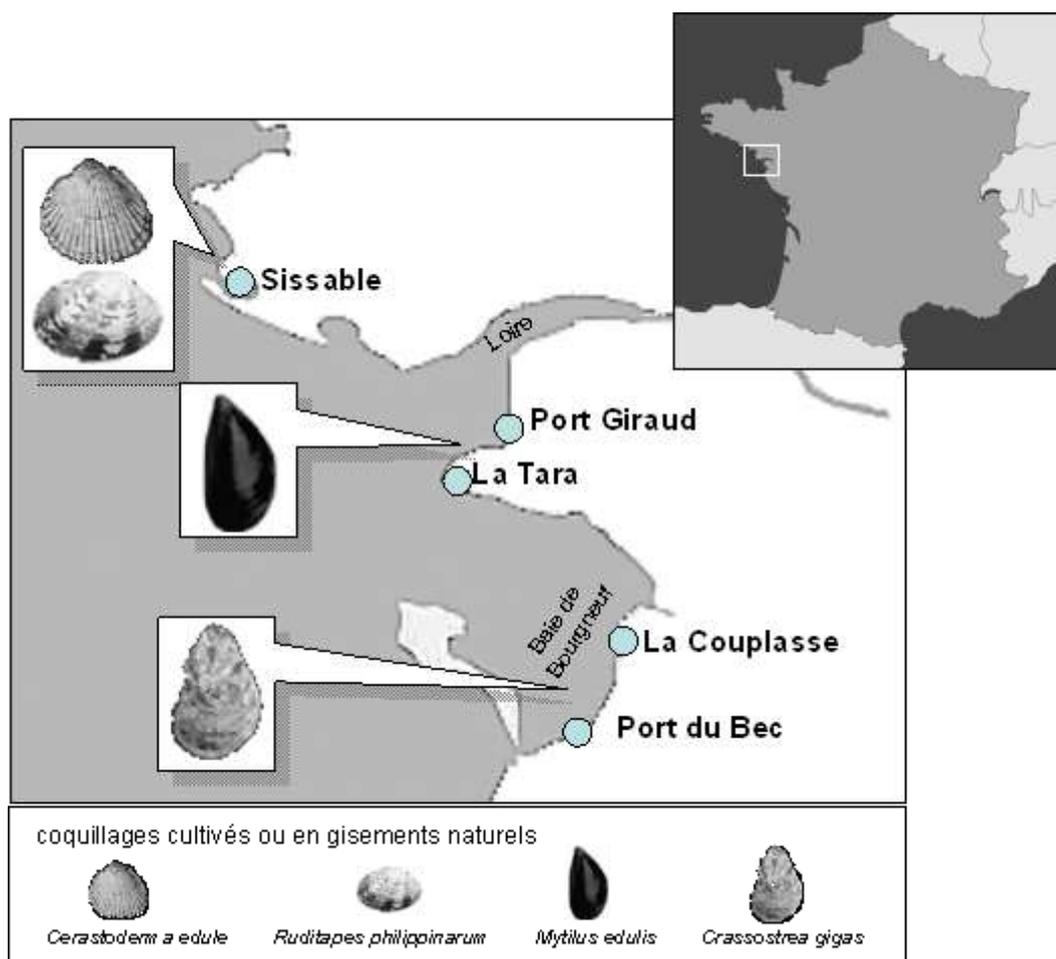


Figure 1-2 : Carte des différents lieux de prélèvements

- **Zone 1 – Le Traict du Croisic** : c'est une lagune entièrement découverte à marée basse qui alimente en eau les marais salants de Guérande. Les prélèvements sont effectués à **Sissable** (47° 18'11 N, 2°29'55 O), zone vaseuse où sont cultivés des coquillages fouisseurs filtreurs, coques (*Cerastoderma edule*) et palourdes (*Ruditapes philippinarum*).
- **Zone 2 – Rive sud de l'estuaire de la Loire** : il s'agit d'une zone relativement ouverte sur l'Atlantique où sont essentiellement cultivées des moules (*Mytilus edulis*). **Port Giraud** (47° 09'32 N, 2°11'39 O) est une plage présentant un cordon sableux et une dalle rocheuse. Y sont présents parcs à moules et gisements naturels. Un ruisseau se jette à proximité des parcs. **La Tara** (47°09'15 N, 2°13'26 O) est une grande dalle rocheuse présentant peu de zones sableuses. Les moules y sont aussi cultivées et présentent également sous forme de gisements naturels.
- **Zone 3 – Baie de Bourgneuf** : vasière assez étendue limitée par la pointe Saint Gildas au nord et l'île de Noirmoutier au sud. Y sont principalement cultivées les huîtres (*Crassostrea gigas*). **La Couplasse** (47° 00'37 N, 2°01'46 O) est une plage vaseuse présentant des dalles rocheuses plus ou moins étendues. Des parcs à huîtres sont présents. **Le Port du Bec** (46° 56'22 N, 2° 04'36 O) est le plus important port ostréicole vendéen. Les prélèvements sont réalisés sur une plage caractérisée par des zones rocheuse et sableuse, à proximité d'un rejet d'eau usée des bassins ostréicoles.

Les trois sites de Loire-Atlantique (Sissable, Port Giraud et La Tara) ont déjà été étudiés au cours des travaux préalablement réalisés par le Laboratoire à la fin des années 90 (Sallenave, 1999). Les deux autres sites, en Vendée (La Couplasse et le Port du Bec), ont été nouvellement retenus pour cette étude.

## II-1-2- Echantillonnage

La périodicité des prélèvements est de quatre mois : en hiver (janvier/février), printemps/été (mai/juin) et automne (octobre/novembre). Les sédiments sont prélevés en surface et à 5-10 cm de profondeur. Ils sont récoltés dans des flacons stériles puis stockés en chambre froide (4°C) en attente de traitement. Ils reçoivent un ordre d'entrée dans la liste des échantillons du Laboratoire.

Au total, six séries de prélèvements ont été effectuées entre mai 2001 et février 2003. Pour chaque série, les deux types de prélèvements ont été réalisés sur les divers sites choisis. Le nombre d'échantillons étudiés a été au total de 54.

## II-1-3- Préparation et mise en culture des échantillons

Chaque échantillon est dilué au 50<sup>ème</sup> (1g de sédiment dans 49 mL d'eau de mer stérilisée) en condition aseptique sous hotte à flux laminaire. Quelques gouttes de Tween 80 sont ajoutées pour faciliter la mise en suspension des spores fixées aux grains de sable. Les tubes sont agités avant ensemencement.

Les cultures sont réalisées sur milieu gélosé DCA (Dextrose 40 g/L, digestion enzymatique de Caséine 10 g/L, Agar 15 g/L). Pour se rapprocher des conditions marines (salinité et éléments minéraux), l'eau distillée est remplacée par de l'eau de mer naturelle. Les milieux sont supplémentés de chloramphénicol (50 mg/L) pour éviter le développement bactérien qui pourrait gêner celui des champignons. La gélose nutritive est ensuite stérilisée par autoclavage (20 min, 121°C) avant d'être coulée dans des boîtes de Petri (20 cm).

Après solidification de la gélose, l'ensemencement est réalisé par la méthode du râteau : 4 mL de suspension de sédiments préparées au préalable sont pipetées et étalées sur la surface gélosée à l'aide d'un râteau jusqu'à absorption par le milieu. Chaque échantillon de sédiment étudié est analysé en triplicats. Les boîtes de Petri sont ensuite mises à incuber à 27°C en étuve.

## II-1-4- Isolement, identification et conservation des champignons

Les champignons formant des colonies morphologiquement distinctes sont dénombrés et isolés au fur et à mesure de leur apparition par repiquage sur des boîtes de Petri de 10 cm de diamètre contenant du milieu DCA. Les champignons ainsi isolés sont ensuite identifiés et repiqués sur un culot de gélose (DCA) en tube. Lorsqu'ils sont suffisamment développés, ils sont recouverts par une couche d'huile de paraffine et stockés dans la Mycothèque Marine du SMAB (MMS).

L'identification des souches repose sur une observation macroscopique et microscopique. La visualisation macroscopique reste assez aléatoire (les caractéristiques morphologiques des champignons varient énormément en fonction des milieux de cultures utilisés). Toutefois, elle peut faciliter la reconnaissance de certains genres comme les *Trichoderma*, *Aspergillus* et *Penicillium*.

L'identification générique se fait principalement par observation microscopique des lames réalisées selon la technique du ruban adhésif (méthode du drapeau de Roth) très simple à réaliser : un fragment de ruban adhésif est saisi entre les mors d'une pince hémostatique et appliqué à la surface de la culture, puis il est placé sur une lame dans une goutte de colorant. Les colorants utilisés sont le bleu coton et le rouge Congo qui colorent le mycélium et les parois fongiques respectivement. La lame est ensuite examinée sous microscope optique (GX400). Compte tenu de la difficulté dans l'identification spécifique des souches isolées, l'identification est limitée au genre.



Les cinquante-quatre échantillons ont été traités permettant d'enrichir la Mycothèque Marine du Laboratoire de près de 400 souches. Quatorze genres principaux de champignons ont été identifiés appartenant tous au sous-embranchement des Ascomycètes : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Acremonium*, *Verticillium*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*, *Dissitimurus*, *Geotrichum*, *Chrysonilia*, *Gliocladium* et *Paecilomyces*.

## II-3- Analyse des résultats

### II-3-1- Composition globale de la microfonge

La compilation des résultats obtenus nous permet de mieux caractériser la microfonge saprotrophe implantée au niveau des zones conchylicoles (Figure 1-3).

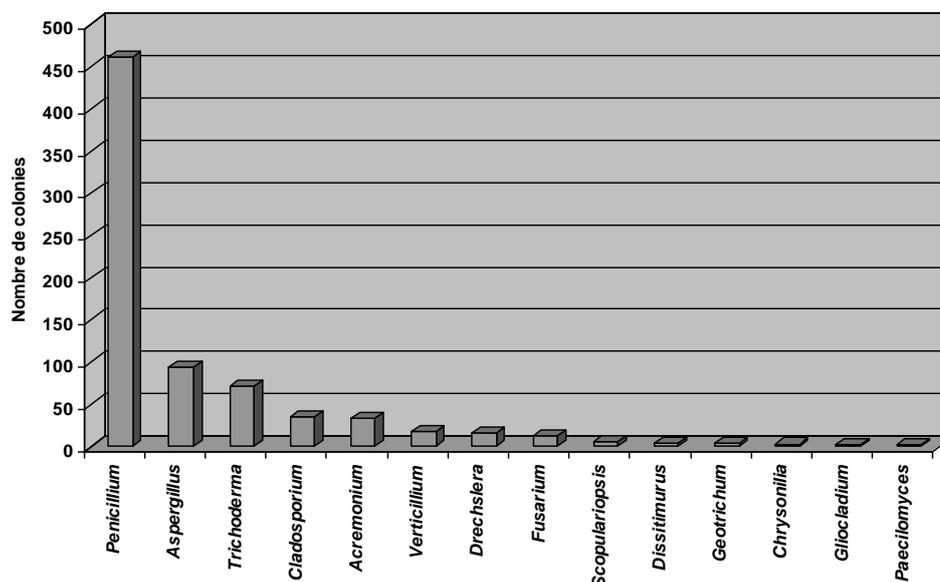


Figure 1-3 : Nombre total de colonies par genre identifié d'Ascomycètes

Les différents genres peuvent être classés en quatre groupes en fonction de leur ordre décroissant d'importance :

- Le premier groupe comprend les souches appartenant au genre *Penicillium*. Plus de 450 colonies ont été dénombrées pour ce genre, représentant plus de 50 % de la totalité des observations.
- Le deuxième groupe comprend les souches identifiées comme appartenant aux genres *Aspergillus* et *Trichoderma* (12 et 9% respectivement) que l'on peut qualifier d'abondantes.
- Le troisième groupe correspond aux souches des genres *Cladosporium* (5%) et *Acremonium* (4%), sporadiques.
- Le quatrième regroupe les autres genres dont l'abondance globale est inférieure à 3% (espèces très rares) : *Verticillium*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*, *Dissitimurus*, *Geotrichum*, *Chrysonilia*, *Gliocladium* et *Paecilomyces*.

Ces résultats montrent que la microfonge saprotrophe au niveau des sites étudiés est principalement caractérisée par des souches appartenant aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium* et *Acremonium*. Ces cinq genres regroupent, à eux seuls, 90% des souches isolées.

Il est intéressant de comparer ces résultats avec les genres fréquemment identifiés et décrits dans des zones géographiques différentes. Ainsi, l'étude réalisée au niveau d'écosystèmes côtiers au Danemark (Rees et Jones, 1985) montre que les champignons les plus fréquemment isolés présentent à la fois des similitudes et des différences avec nos résultats. Les auteurs ont classés les champignons par genre en fonction de leur fréquence d'isolement :

- *Cladosporium*, *Penicillium* et *Fusarium* : fréquents à communs
- *Acremonium* : sporadiques à fréquents
- *Trichoderma* et *Aspergillus* : rares

Les différences observées avec nos résultats peuvent, peut-être, être expliquées par des différences de nature des prélèvements étudiés : dans un cas des sédiments riches en matière organiques (zones conchylicoles) et dans l'autre des sables pauvres en matières organiques (plages).

Des constats similaires peuvent être effectués au niveau d'autres zones géographiques. Les genres de champignons les plus fréquemment isolés sont souvent les mêmes mais leur ordre d'importance varie selon les zones :

- sédiments côtiers de l'archipel hawaïen : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Acremonium* et *Cladosporium* (Wright Steele, 1967)
- plage brésilienne : *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* et *Acremonium* (de Moura Sarquis et de Oliveira, 1996)
- plages mexicaines : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* et *Cladosporium* (del Carmen Gonzalez *et al.*, 1998)

Ces différents travaux montrent que l'ordre d'importance des principaux genres de champignons isolés pourrait être spécifique et caractéristique des zones géographiques étudiées. Il est d'ailleurs intéressant de constater qu'aucun champignon appartenant au genre *Penicillium* n'a été isolé lors de l'étude de la microfonge saprotrophe de la plage d'Ipanema Beach (Rio de Janeiro) (de Moura Sarquis et de Oliveira, 1996)

La campagne de prélèvement entreprise nous a permis de réaliser une étude comparative de la microfonge saprotrophe en zones conchylicoles en fonction des lieux, des types et des saisons de prélèvements. Dans les chapitres qui suivent, sont exposés les constats effectués en tenant compte des genres les plus représentatifs des souches identifiées : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium* et *Acremonium*. Les souches correspondant aux genres les moins fréquemment identifiés sont rassemblées dans le groupe « autres ».

## II-3-2- Etude en fonction des sites de prélèvements

Le profil global de la microfonge en fonction des lieux de prélèvements est présenté Figure 1-4.

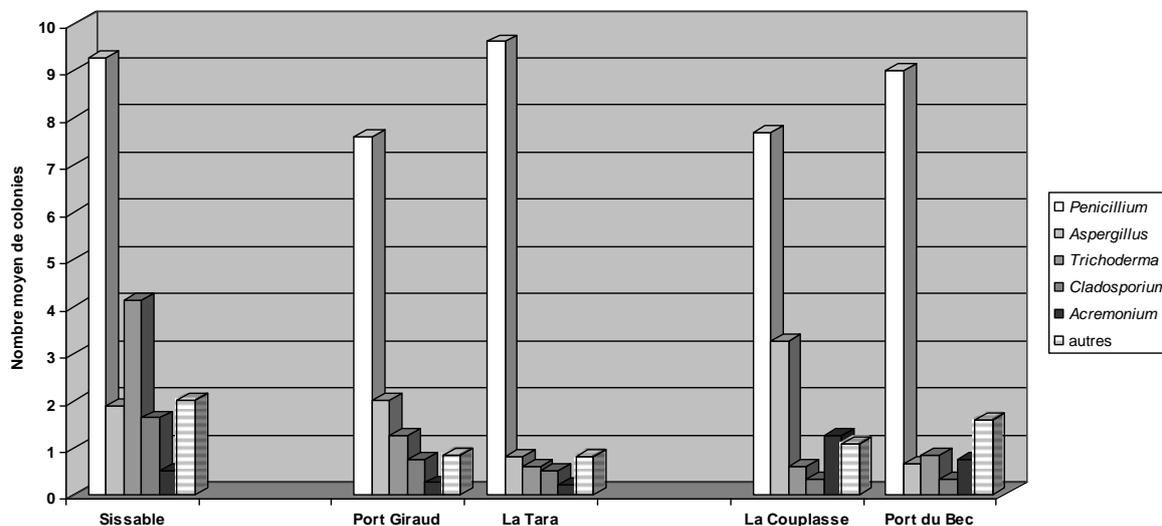


Figure 1-4 : Nombre moyen de colonies isolées par lieu

Si globalement les profils observés entre les différents sites ont des points communs (majorité de *Penicillium* sp.), ils diffèrent par contre sur la répartition des autres genres principaux. Néanmoins, on peut constater des similitudes pour les sites de zones identiques. En effet, la comparaison des profils de la microfonge peut faire ressortir certaines caractéristiques en fonction des trois zones étudiées : le traict du Croisic (Sissable), l'estuaire de la Loire (Port Giraud et La Tara) et la baie de Bourgneuf (La Couplasse et le Port du Bec).

Le Croisic semble nettement caractérisé par la présence de champignons des genres *Trichoderma* et *Cladosporium*. Les « autres » champignons occupent une place importante, notamment par l'isolement de plusieurs colonies appartenant aux genres *Drechslera* et *Fusarium*.

Au niveau de la zone de l'estuaire de la Loire, la répartition de la microfonge globale est assez proche pour les deux lieux, Port Giraud et La Tara, principalement caractérisés par la présence des genres *Aspergillus*, *Trichoderma* et *Cladosporium*.

Les deux lieux représentant la baie de Bourgneuf montrent des profils semblables entre eux avec cependant une augmentation du nombre de souches appartenant aux genres *Aspergillus* et *Acremonium* pour La Couplasse.

D'une manière globale, cette compilation de données met en exergue le profil particulier de la microfonge de la zone du traict du Croisic par rapport aux deux autres zones. En effet, la prédominance des champignons du genre *Penicillium* y semble moins importante et les colonies dénombrées appartenant au genre *Trichoderma* y sont nettement plus abondantes que dans les autres lieux. Cette différence pourrait être due aux caractéristiques topographiques particulières du traict du Croisic, zone lagunaire beaucoup plus fermée que les autres sites d'étude.

### II-3-3- Etude en fonction du type de prélèvement

La réalisation de deux types de prélèvement au niveau de la surface des sédiments, et à 5-10 cm de profondeur nous a permis de mettre en évidence que la microfonge globale était représentée par les mêmes genres d'Ascomycètes (Figure 1-5).

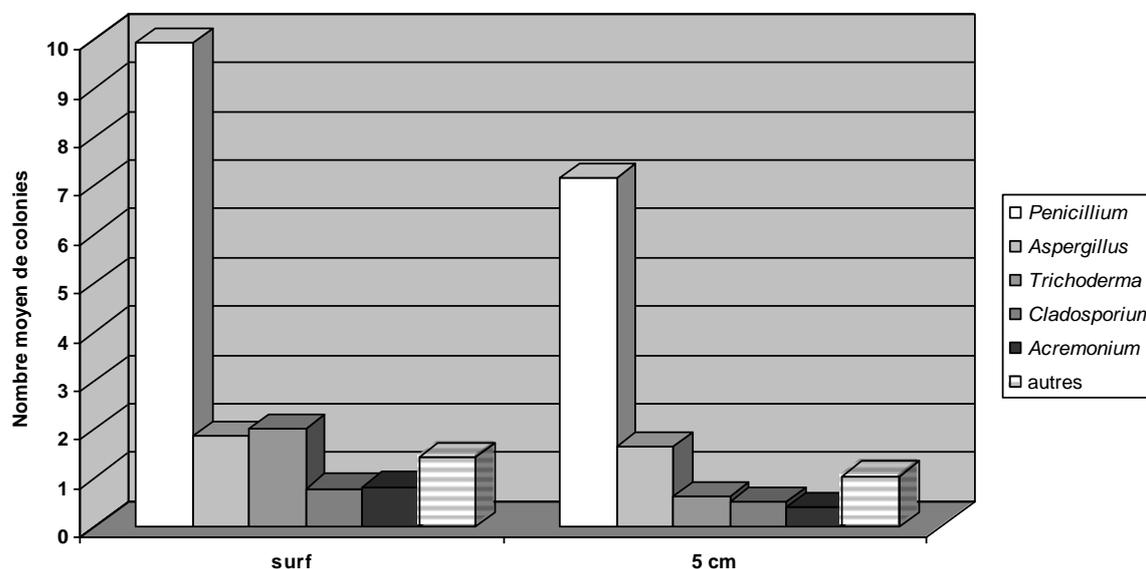


Figure 1-5 : Nombre moyen de colonies isolées par type de sédiments

Des points communs peuvent être constatés entre les deux types de prélèvements :

- le genre *Penicillium* domine
- le nombre moyen de colonies appartenant aux genres *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Acremonium* est similaire entre surface et profondeur

Les profils généraux sont sensiblement identiques. La principale différence entre les deux types de prélèvements correspond à une microfonge moins riche à 5 cm de profondeur. Les travaux réalisés précédemment par le Laboratoire avaient montré que les sédiments de profondeur pouvaient représenter un meilleur indicateur des souches réellement implantées en milieu marin (Sallenave, 1999). Si l'on compare le nombre de colonies par genre pour les prélèvements deux à deux (même lieu et même date mais pour des types de sédiments différents), une corrélation de 0,755 est observée faisant bien apparaître cette légère différence.

## II-3-4- Etude en fonction des saisons

La variation globale de la microfonge saprotrophe cours des trois saisons étudiées, printemps/été, automne et hiver est présentée Figure 1-6.

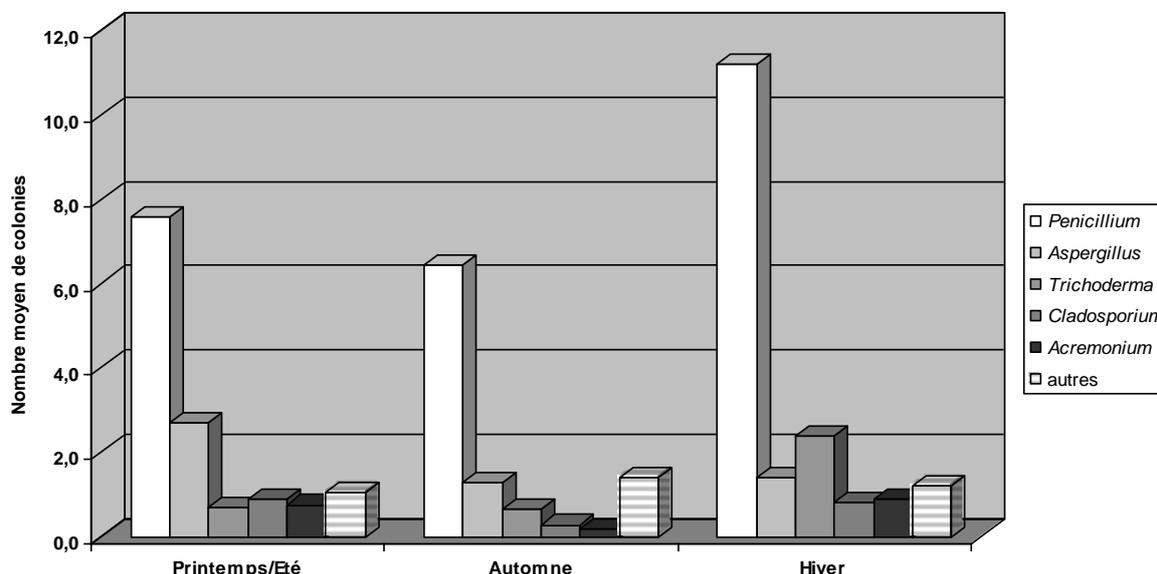


Figure 1-6 : Variation saisonnière de la microfonge

Le nombre moyen de colonies est plus important pendant les saisons hivernales. Cette observation est en adéquation avec les travaux de de Moura Sarquis et de Oliveira (1996) qui ont montré, en termes de distribution saisonnière, un nombre plus important de champignons filamenteux isolés pendant la saison hivernale et plus faible pendant la période estivale.

Des disparités saisonnières sont nettement observables. Mis à part les *Penicillium* sp., prépondérants quelque soit la saison, d'autres genres sont plus variables d'une saison à une autre. Ainsi, les *Trichoderma* sp. sont globalement plus présents en hiver qu'en automne et printemps/été. Les *Aspergillus* sp., eux, ont été plus dénombrés au printemps/été, qu'en automne et hiver.

Ces variations sont observées pour des champignons largement répandus dans ces écosystèmes. Néanmoins, pour des moisissures plus faiblement isolées telles que celles appartenant aux genres *Cladosporium* et *Acremonium*, il semblerait que les saisons automnales soient moins propices à leur développement. Ces remarques montrent une variation saisonnière globale de la microfonge.

## II-4- Conclusion

Cette étude, qui s'est déroulée sur trois années, a permis de montrer une grande richesse fongique au niveau des sédiments de zones conchylicoles. Cette microfonge est principalement caractérisée par la dominance de trois genres d'Ascomycètes : *Penicillium*, *Aspergillus* et *Trichoderma*.

Les communautés fongiques semblent représentatives des écosystèmes étudiés, ce qui laisse suggérer que les champignons isolés ne correspondent pas seulement à des passages aléatoires mais à une réelle implantation en zones conchylicoles.

Une variabilité saisonnière de la microfonge a également pu être mise en évidence. Il semblerait que l'implantation ou le développement des souches appartenant au genre *Trichoderma* dans ces zones soit favorisé en période hivernale et principalement dans les zones lagunaires comme Le Croisic. Dans ce cas précis, le risque toxique pour les coques et leurs consommateurs serait plus important à cette saison.

Au cours de ces campagnes de prélèvements, de nombreux champignons ont été isolés et conservés dans la Mycothèque du Laboratoire. Aujourd'hui plus de 1000 souches constituent cette collection.

L'implantation des champignons dans les zones conchylicoles pourrait représenter une source de métabolites disponibles pour les coquillages cultivés : certaines peuvent avoir des effets négatifs sur ces organismes ou les consommateurs (toxines), d'autres peuvent, par contre, avoir un intérêt nutritif ou nutritionnel (lipides, acides gras).

Afin de pouvoir mener des études sur ces deux concepts, il convient dans un premier temps de mieux connaître les productions de ces métabolites par les champignons en milieu marin. Pour cela, des souches ont été choisies afin d'étudier leur production de lipides d'intérêt et de peptaïbols (peptides toxiques).

# P1-III- Champignons étudiés pour leurs métabolites

## III-1- Choix des souches

Comme nous venons de l'annoncer, il est intéressant d'étudier les champignons isolés des zones conchylicoles d'une part en tant que source de métabolites valorisables et d'autre part en tant que source de contamination de la chaîne alimentaire marine.

Les champignons sont des organismes faciles à cultiver, permettant une production de biomasse importante et inépuisable qui, à priori, pourraient représenter une originalité en termes de lipides et d'acides gras.

D'un autre côté, les travaux précédemment entrepris par le Laboratoire ont montré l'implication potentielle des peptaïbols, peptides linaires neuroactifs produits par des souches de *Trichoderma*, dans les phénomènes de contamination de coquillages.

Nous avons donc sélectionné des souches fongiques d'une part, valorisables pour la recherche de lipides et d'autre part intéressantes pour le potentiel toxigène et leur production de peptides toxiques, les peptaïbols.

Les champignons du genre *Penicillium*, qui étaient les plus fréquemment isolés dans l'étude précédente, nous ont paru être les plus intéressants à étudier. Pour l'étude du métabolisme lipidique et du potentiel nutritionnel et pharmacologique des acides gras, nous avons choisi deux souches de *Penicillium* isolées au cours de la campagne 2001/2003. Ces deux souches sont *Penicillium vermiculatum* (MMS 697) et *Penicillium citreonigrum* (MMS 1090) qui ont été choisies, la première car elle représentait un phénotype fréquent chez les *Penicillium* sp. observés et la seconde pour l'originalité de son phénotype.

En ce qui concerne l'évaluation du potentiel toxigène liée à la production de peptaïbols, deux souches de *Trichoderma* ont été sélectionnées. La première, *Trichoderma longibrachiatum* (MMS 151) correspond à une souche de référence, isolée lors de l'étude de la recherche de souches toxigènes et déjà étudiée pour sa production de peptaïbols. La seconde a été isolée au cours de la même série de prélèvements que les deux souches de *Penicillium*.

A titre de comparaison avec les souches de *Penicillium*, la production lipidique et l'analyse de la composition en acides gras ont également été réalisées chez les souches de *Trichoderma*.

## III-2- *Penicillium vermiculatum* et *Penicillium citreonigrum*

### III-2-1- Classification

Les *Penicillium* sont des champignons saprotrophes très largement répandus dans la nature aussi bien en milieu terrestre que marin comme nous avons pu le voir précédemment. Les espèces de *Penicillium* sont des champignons filamenteux supérieurs appartenant au sous-embranchement des Ascomycètes. Longtemps regroupés dans les Deuteromycotina (« Deutéromycètes » ou champignons imparfaits), car exclusivement connus sous leur forme anamorphe, ils sont désormais pour la plupart, associés aux formes téléomorphes *Talaromyces* et *Eupenicillium*. Leur classification est présentée ci-dessous (Tableau 1-2/ Tableau 1-1).

Tableau 1-2: Taxonomie des espèces *Penicillium vermiculatum* et *Penicillium citreonigrum*

	<i>Penicillium vermiculatum</i> Dangeard	<i>Penicillium citreonigrum</i> Dierckx
<b>Embranchement</b>	Eumycota	Eumycota
<b>Sous-embranchement</b>	Ascomycotina	Ascomycotina
<b>Classe</b>	Plectomycetidae	Plectomycetidae
<b>Ordre</b>	Eurotiales	Eurotiales
<b>Famille</b>	Trichocomaceae / Eutotiaceae	Trichocomaceae / Eutotiaceae
<b>Téléomorphe</b>	<i>Talaromyces flavus</i> (Klöcker) Stolck & Samson	<i>Eupenicillium euglaucum</i> (Van Beyma) Stolk & Samson

La classification des *Penicillium* n'est pas chose facile. Des classifications ont été proposées à partir de critères morphologiques et physiologiques (comme la mesure du diamètre de croissance des colonies) ou encore en comparant la production de métabolites. Pitt considère à l'heure actuelle que toutes ces études complémentaires doivent être réunies pour mener à bien la classification des *Penicillium*.

En 1949, Raper et Thom proposèrent une première classification qui reste encore aujourd'hui la base de la taxonomie des *Penicillium*. A partir de la classification de Raper et Thom, Pitt (1979) sépara les espèces pour lesquelles la forme téléomorphe était inconnue en 4 sous-genres selon la complexité des pénicilles (ensemble formé par les conidiophores et les phialides) observés :

- *P.* subgenus ***Aspergilloides*** : pénicilles monoverticillées
- *P.* subgenus ***Penicillium*** : pénicilles ter ou quaterverticillées
- *P.* subgenus ***Biverticillium*** : pénicilles biverticillées à phialides lancéolées
- *P.* subgenus ***Furcatum*** : pénicilles biverticillées à phialides ampulliformes

La classification des espèces dans les différents sous-genres est ensuite réalisée en comparant les critères morphologiques microscopiques, la croissance et la morphologie des colonies. Chaque sous-genre comprend plusieurs sections dont certaines peuvent contenir des séries. Aujourd'hui le nombre d'espèces s'élève à plus de 250.

## III-2-2- Isolement et identification des souches étudiées

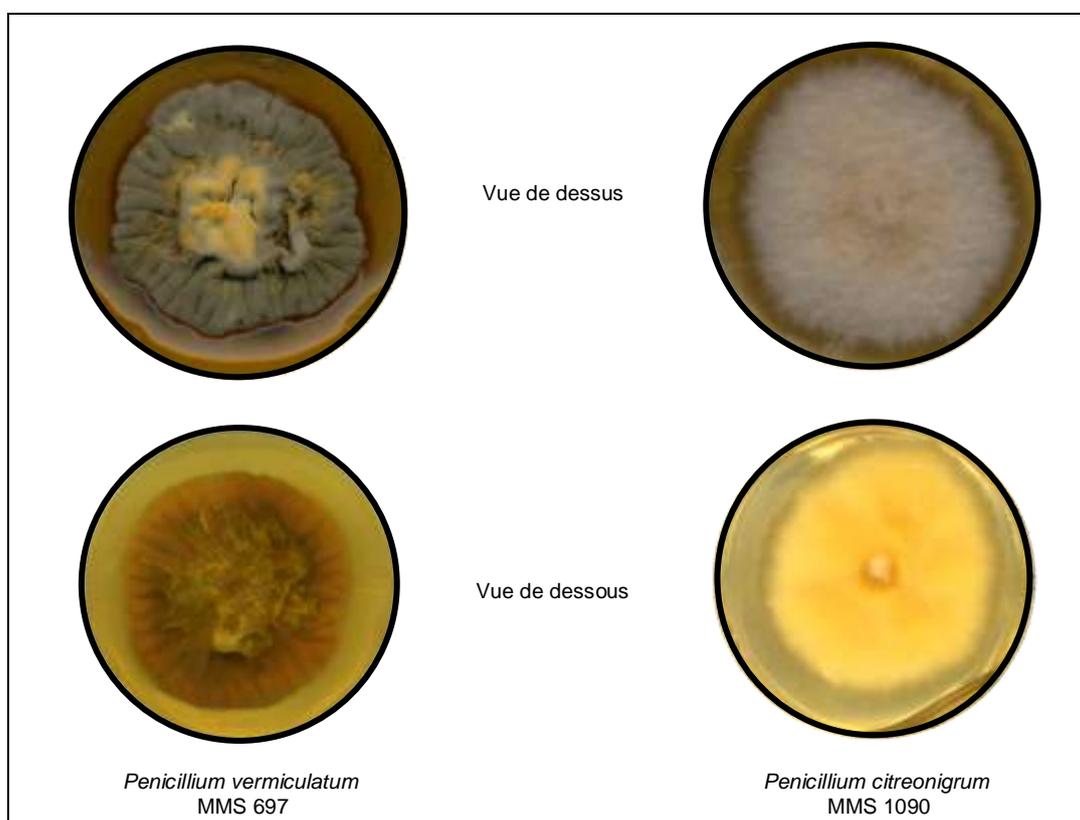
La souche de *Penicillium vermiculatum* a été isolée à partir de sédiments au Port du Bec (Vendée) en juin 2001. Elle est référencée sous le numéro MMS 697. La détermination de l'espèce a été réalisée par M.F. Roquebert (MNHN) par méthode morphologique comme *Talaromyces flavus*.

La souche de *Penicillium citreonigrum* a été isolée plus récemment (février 2003) au même site à partir de sédiments. Elle porte la référence MMS 1090. L'identification de l'espèce a été réalisée par J. Bisset.

## III-2-3- Morphologie

### III-2-3-1-1- Aspect macroscopique

Les aspects macroscopiques de *Penicillium vermiculatum* et *P. citreonigrum* sont présentés Figure 1-7.



**Figure 1-7 : Morphologie des souches *Penicillium vermiculatum* et *Penicillium citreonigrum* cultivées sur milieu DCA**

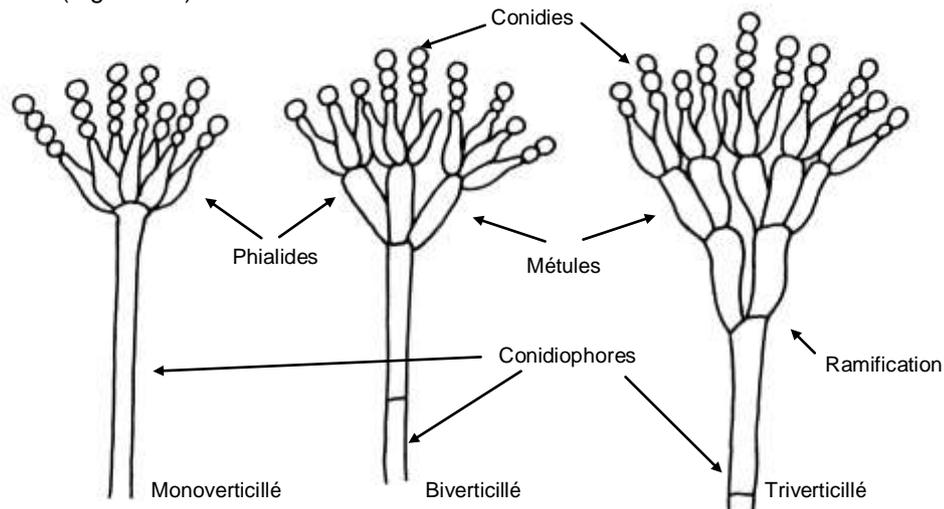
Cultivé en milieu DCA, en vue de dessus, *P. vermiculatum* montre un aspect très plissé, vallonné et poudreux. Son thalle présente une coloration jaune au centre et verte en périphérie. Le verso de la moisissure est également très plissé et dans les tons orangés.

Les caractéristiques morphologiques de *P. citreonigrum* sont très différentes de *P. vermiculatum* sur milieu DCA. Il s'agit d'une moisissure de couleur blanche qui tend au rose saumon en vieillissant. Le thalle a un aspect floconneux et épouse la surface gélosée. Le verso de la culture montre un aspect très lisse du champignon de couleur jaune orangée.

### III-2-3-1-2- Aspect microscopique

Les espèces de *Penicillium* présentent des conidiophores se développant perpendiculairement au mycélium, isolés ou groupés, hyalins, lisses ou granuleux et terminés par un pécicille. Les pécicilles sont constitués selon les espèces d'un simple verticille de phialides (monoverticillés), soit d'un verticille de ramification (métules) portant les phialides (biverticillés), soit de plusieurs verticilles successifs portant des ramifications, des métules et des phialides (triverticillées, quadriverticillées).

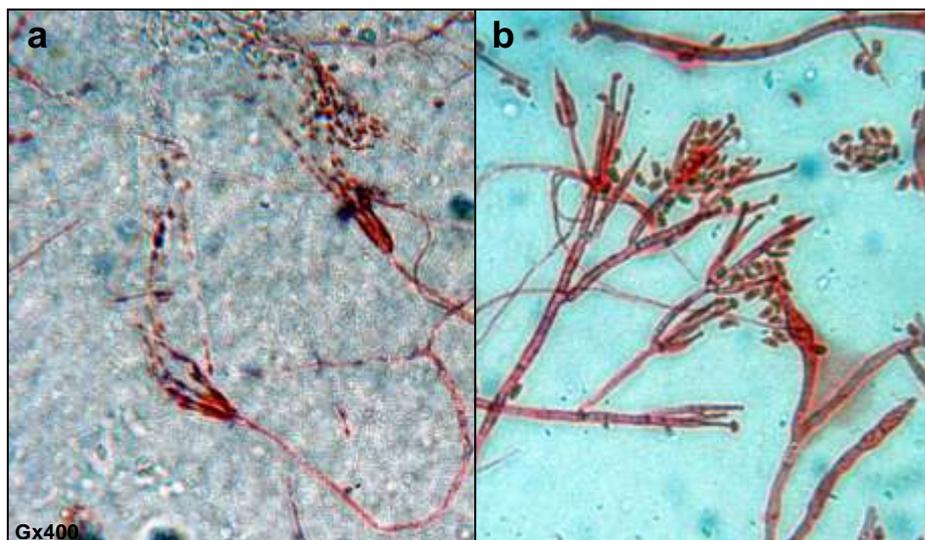
Les phialides sont généralement ampulliformes ou lancéolés, portant à leur sommet les conidies, réunies en chaînette (Figure 1-8).



**Figure 1-8 : Structures morphologiques du genre *Penicillium***

(d'après Botton *et al.*, 1990)

L'observation microscopique réalisée par coloration au rouge Congo pour les deux espèces de *Penicillium* est présentée page suivante (Figure 1-9).



**Figure 1-9 : Observation microscopique de *P. vermiculatum* (a) et *P. citreonigrum* (b) (coloration rouge Congo)**

L'observation microscopique au grossissement 400 permet de distinguer la présence de pécicilles monoverticillés constitués de trois phialides et de conidies regroupées en chaînette chez *Penicillium vermiculatum*.

*Penicillium citreonigrum* présente des pénicilles triverticillés contrairement à *P. vermiculatum*. Des différences sont également notées entre les deux souches comme par exemple l'absence de chaînettes de spores chez *P. citreonigrum*, la forme asymétrique ou réniforme des conidies ou encore la présence de phialides longues verticillées se rapprochant des caractéristiques morphologiques des genres *Gliocladium* et *Verticillium*.

### III-3- *Trichoderma longibrachiatum* et *Trichoderma harzianum*

#### III-3-1- Classification

Les *Trichoderma* sp. sont des champignons saprotrophes très communs dans le sol et sur les matières végétales en décomposition, connus pour représenter un réel intérêt économique en raison de leur fort potentiel enzymatique. Ils ont également été isolés à partir du milieu marin dans des zones géographiques très variées. Ce sont, au même titre que les *Penicillium* sp., des champignons filamenteux supérieurs appartenant au sous-branchement des Ascomycètes. Ils correspondent à une des formes anamorphes du genre *Hypocrea* et ont longtemps étaient classés dans les Deutéromycètes. Leur taxonomie est présentée ci-dessous (Tableau 1-3).

Tableau 1-3: Taxonomie des espèces *Trichoderma longibrachiatum* et *Trichoderma harzianum*

	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai
<b>Embranchement</b>	Eumycota	Eumycota
<b>Sous-embranchement</b>	Ascomycotina	Ascomycotina
<b>Classe</b>	Sordariomycetidae	Sordariomycetidae
<b>Ordre</b>	Hypocreales	Hypocreales
<b>Famille</b>	Hypocreacea	Hypocreacea
<b>Téléomorphe</b>	<i>Hypocrea schweinitzii</i> (Fries) Saccardo	<i>Hypocrea lixii</i> Pat

La classification des espèces de *Trichoderma* n'est pas simple et a été plusieurs fois reconsidérée par les spécialistes. Rifai (1969) fut le premier à proposer une classification des *Trichoderma*. Il différencia neuf espèces ou agrégats d'espèces en se basant sur les caractères morphologiques microscopiques : *T. piluliferum* Webster & Rifai, *T. polysporum* (Link : Fr.) Rifai, *T. hamatum* (Bonord.) Bain., *T. koningii* Oudemans, *T. aureoviride* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai et *T. viride* Pers.ex. S.F. Gray.

Néanmoins, Rifai conclut de ses travaux qu'une classification basée uniquement sur les caractères anamorphes restait insuffisante pour la classification des *Trichoderma*. Bissett reconsidéra la classification des *Trichoderma* selon Rifai car si certains agrégats d'espèces étaient bien définis comme *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. piluliferum*, *T. polysporum* et *T. pseudokoningii*, d'autres se montraient beaucoup plus complexes et certaines espèces nouvelles étaient exclues de cette classification.

Bissett définit alors 5 sections dans lesquelles se répartissent les espèces du genre *Trichoderma* (Bissett, 1984; Bissett, 1991a; Bissett, 1991b; Bissett, 1991c) :

- Section *Trichoderma* : *T. aureoviride*, *T. atroviride*, *T. koningii* et *T. viride*.
- Section *Pachybasium* : *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. virens*, *T. fasciculatum*, *T. flavofuscum*, *T. croceum*, *T. minutisporum*, *T. tomentosum*, *T. fertile*, *T. longipilis*, *T. oblongisporum*, *T. strigosum*, *T. strictipilis*, *T. pubescens*, *T. spirale* et récemment *T. brevicompactum*, nouvelle espèce associée à cette section (Kraus *et al.*, 2004).
- Section *Longibrachiatum* : *T. longibrachiatum*, *T. reesei*, *T. pseudokoningii*, *T. citrinoviride*, *T. parceramosum* et *T. todica*.
- Section *Saturnisporum* : *T. saturnisporum* et *T. ghanense*
- Section *Hypocreanum* : *T. lactea*

D'autres propositions de regroupements ont été réalisées depuis les travaux de Bissett et la définition précise des espèces pose encore de nombreux problèmes (à l'heure actuelle, plus de 70 espèces sont répertoriées pour le genre *Trichoderma*).

### III-3-2- Isolement et identification des souches étudiées

La souche de *T. longibrachiatum* a été isolée à partir d'échantillons de moules prélevées à Tharon (Loire-Atlantique) en mars 1996 et a été référencée dans la Mycothèque du Laboratoire sous le numéro 151. Elle porte ainsi la référence MMS 151.

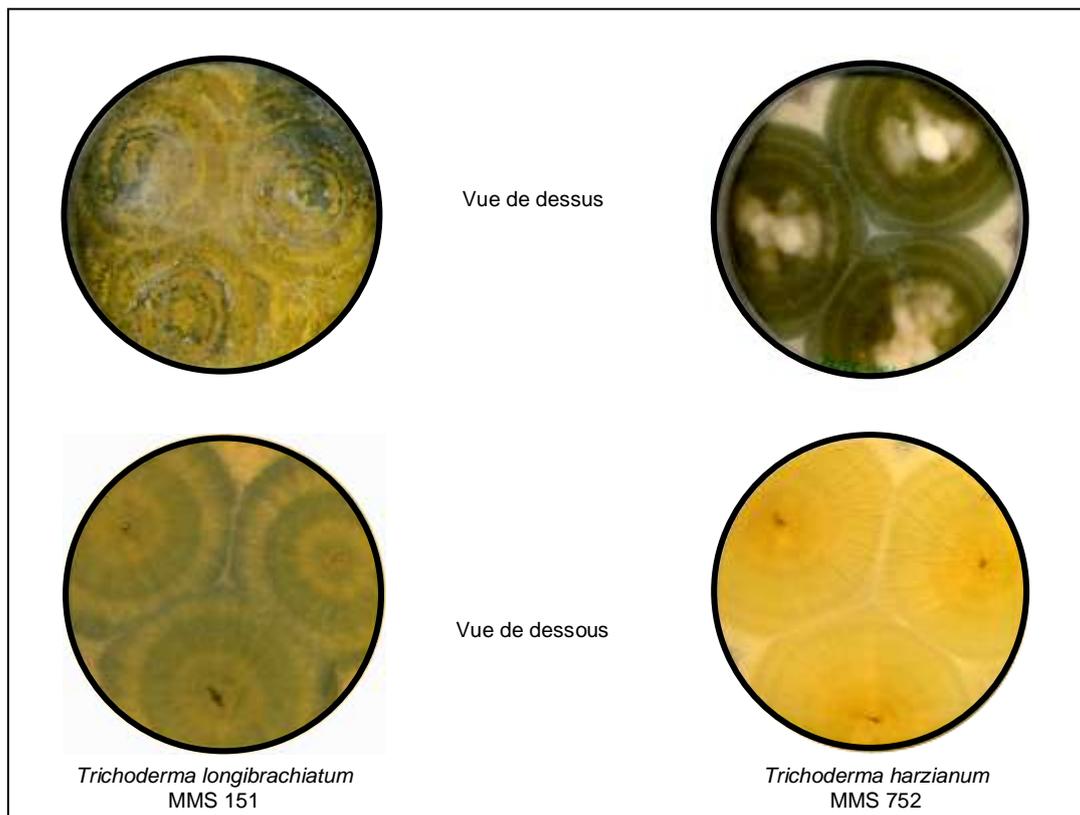
La souche de *T. harzianum* a été isolée en juin 2001 à partir d'échantillons de sédiments prélevés à La Couplasse (Loire-Atlantique) et porte la référence MMS 752.

Les deux souches de *Trichoderma* ont été identifiées comme appartenant respectivement à la section *Longibrachiatum* (MMS 151) et à l'espèce *harzianum* (MMS 752) par J. Bisset. Cette identification est basée sur des analyses morphologique et métabolique. Pour *T. longibrachiatum*, l'analyse a été complétée par le séquençage du gène ARNr 5.8S et des espaceurs transcrits internes de l'ADN ribosomal.

### III-3-3- Morphologie

#### III-3-3-1- Aspect macroscopique

Les aspects macroscopiques des deux souches de *Trichoderma* sont présentés Figure 1-10.



**Figure 1-10 : Morphologie des souches *Trichoderma longibrachiatum* et *Trichoderma harzianum* cultivées sur milieu DCA**

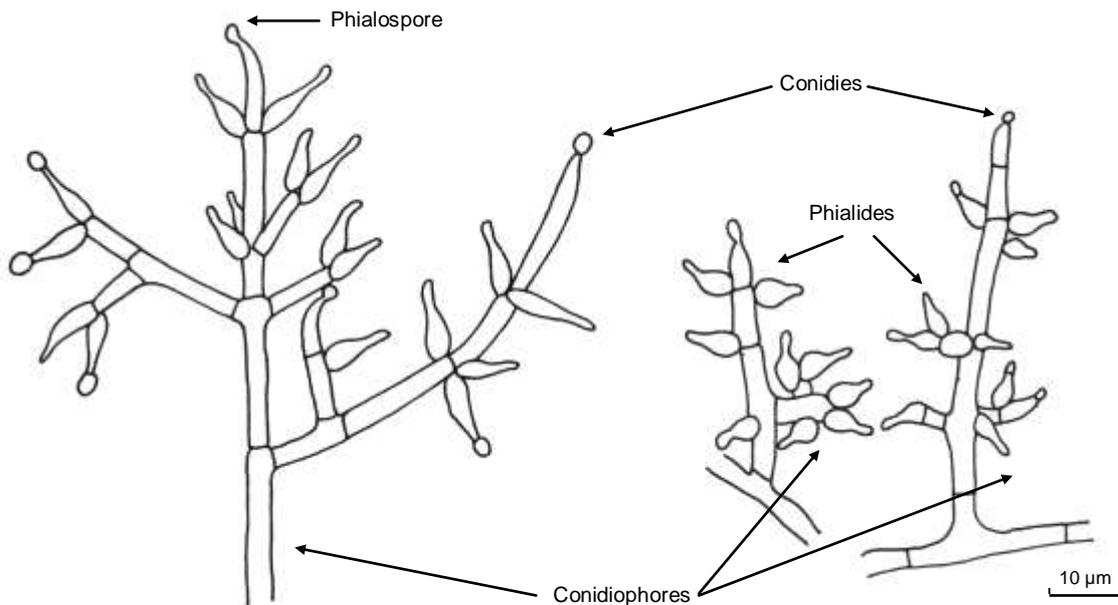
Les deux souches de *Trichoderma* sont caractérisées par une croissance rapide de leur thalle, d'abord lisse puis floconneux à un stade avancé, par la formation d'hyphes aériens. Une des particularités des *Trichoderma* sp. est l'observation de cercles successifs correspondant aux stades alternés de croissance mycélienne (souvent de couleur blanche) et de conidiogénèse (souvent dans les tons jaune vert) due à la pigmentation des phialospores.

Cultivé en boîtes de Petri sur milieu DCA, en vue de dessus, *T. longibrachiatum* présente un thalle d'aspect très friable de couleur jaune vif avec plusieurs zones concentriques dans les tons verts. Au verso, la moisissure est d'abord blanche puis verdit en vieillissant (1 semaine), les alternances de croissance et de conidiogénèse sont visibles.

*T. harzianum* est assez différent, d'aspect beaucoup plus duveteux que friable comme c'était le cas chez *T. longibrachiatum*. Là aussi, les alternances de croissance et de conidiogénèse sont observées entre les zones blanches et vertes. Le centre de chaque colonie devient très cotonneux en vieillissant. Le revers montre un aspect légèrement plissé de couleur jaune. Les alternances croissance / conidiogénèse sont également visibles en vue de dessous.

### III-3-3-2- Aspect microscopique

Les espèces de *Trichoderma* présentent des conidiophores très ramifiés, souvent en touffes plus ou moins compactes, de forme conique ou pyramidale, irrégulièrement verticillés avec des ramifications à angle droit. Les phialides sont regroupées à l'extrémité des conidiophores et sont généralement en forme de quille, atténuées au sommet, solitaires ou en groupe, perpendiculaires à l'axe. Les phialospores s'individualisent en conidies réunies au sommet des phialides en glomérules où elles sont produites séparément et successivement (Figure 1-11).



(d'après Botton *et al.*, 1990)

Les deux souches montrent de grandes similitudes en observation microscopique très caractéristique de ce genre (Figure 1-12).

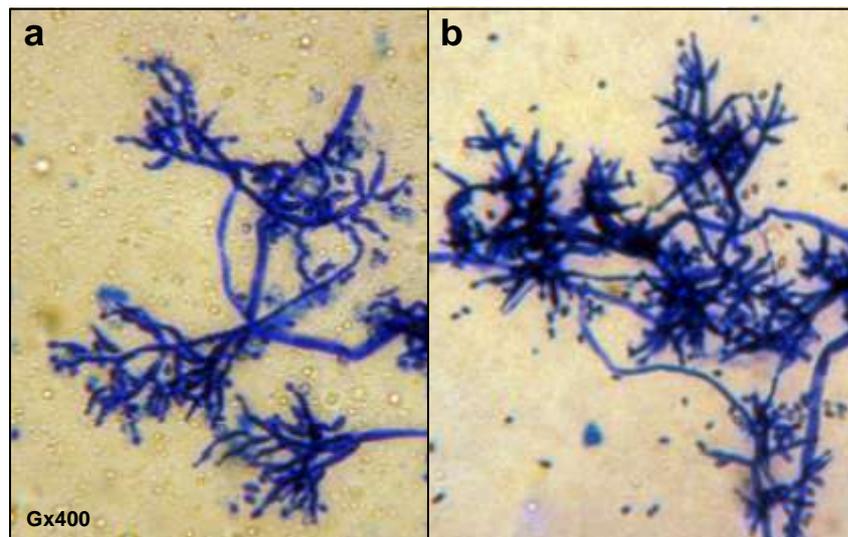


Figure 1-12 : Observation microscopique de *T. longibrachiatum* MMS 151 (a) et *T. harzianum* MMS 752 (b) (coloration bleu coton)

Les filaments présentent des conidiophores en touffes plus ou moins compactes qui sont très ramifiés. Les conidiophores supportent des phialides, perpendiculaires et en forme de quille, bourgeonnant des conidies, ici non regroupées en glomérules.

## III-4- Mise en culture des souches sélectionnées

Les souches sélectionnées ont été étudiées pour leur métabolisme lipidique ou pour leur production de peptaïbols. Afin de présenter une cohérence dans le travail, nous avons choisi de cultiver les quatre souches sur un milieu de culture identique pour toutes les études pharmacochimiques. Avant de réaliser les cultures en masse nécessaires à l'obtention de matières premières en quantités suffisantes, il a fallu définir des conditions de culture optimales pour cette étude.

### III-4-1- Choix du milieu

#### III-4-1-1- Type de milieu de fermentation

Il s'agit ici de définir quel type de procédé de fermentation doit être utilisé pour la culture des champignons : culture en milieu solide ou en milieu liquide ?

La plupart des études montrent que les cultures fongiques sont principalement réalisées en milieu liquide. En ce qui concerne les peptaïbols, les travaux réalisés au Laboratoire ont mis en évidence que l'utilisation d'un milieu de culture solide permettait d'augmenter leurs rendements de production (Mohamed-Benkada, 2006). Ainsi, pour la production et l'analyse des peptaïbols l'utilisation de milieux gélosés a été préférée.

A partir de ce constat, nous avons donc opté pour utiliser préférentiellement ce procédé de fermentation en cultures solides, aussi bien pour l'évaluation lipidique que pour l'étude des peptaïbols.

Néanmoins, pour l'étude lipidique, il nous a semblé également important de réaliser une production de biomasse en milieu liquide afin de pouvoir établir une comparaison des productions lipidiques (milieu liquide vs. milieu solide).

#### III-4-1-2- Qualité du milieu de culture

Il s'agit, à ce niveau, de définir la qualité du milieu de culture en termes de composition, c'est-à-dire un milieu riche ou un milieu minimum ?

Le milieu de culture utilisé, jusqu'à présent pour la culture de souches de *Trichoderma* marines et leur production de peptaïbols correspondait à un milieu minimum (milieu Kohlmeyer modifié, KM) dont la seule source azotée est sous forme minérale (nitrate d'ammonium).

Or il apparaît logique, en terme de production lipidique, d'utiliser des milieux riches pour permettre une croissance rapide et optimale des champignons afin d'obtenir des quantités suffisantes de biomasse. Le milieu DCA (Dextrose, Caséine, Agar) sera utilisé aussi bien pour les études lipidiques que pour la production de peptaïbols.

Compte tenu du fait que les peptaïbols ont été jusqu'à présent étudiés au Laboratoire exclusivement par cultures en milieu minimum KM, il sera important de comparer leurs productions obtenues à partir de cultures sur milieu DCA.

## III-4-2- Conditions de cultures

### III-4-2-1- Milieu de base

Les cultures des différentes souches sont ainsi réalisées sur un milieu de base : le milieu DCA. Ce milieu gélosé enrichi est utilisé dans notre travail pour l'étude des lipides et des peptaïbols. Il s'agit du milieu qui a été utilisé pour l'étude mycologique sur la microfonge des zones conchylicoles.

La composition du milieu est la suivante :

- dextrose : 40 g/L
- digestion enzymatique de caséine : 10 g/L
- agar : 15 g/L

Les cultures sont réalisées en boîtes de Petri (20 cm), l'incubation est de 10 jours à 27°C

### III-4-2-2- Milieux comparatifs

Deux milieux comparatifs sont également étudiés

Le premier concerne le milieu GLP (Glucose – Levure – Peptone) qui correspond à un milieu liquide enrichi utilisé pour l'étude comparative de la production lipidique avec le milieu DCA.

Composition :

- glucose : 20 g/L
- extrait de levure : 5 g/L
- peptone : 10 g/L

Les cultures sont réalisées en flasques de 500 mL, l'incubation est de 10 jours à 27°C.

Le second milieu comparatif est le milieu KM qui est un milieu gélosé minimum précédemment utilisé au Laboratoire pour la production de peptaïbols (Mohamed-Benkada, 2006).

Composition :

- glucose : 5 g/L
- sulfate de magnésium  $MgSO_4$  : 2,4 g/L
- nitrate d'ammonium  $NH_4NO_3$  : 2,4 g/L
- tampon tris : 1,21 g
- agar : 15 g/L

Les cultures étaient réalisées en fioles de Roux, puis mises à incuber pendant 21 jours à 27°C. Une comparaison des rendements obtenus sur milieu DCA avec ceux précédemment décrits sur milieu KM sera entreprise.

Afin de se rapprocher des conditions marines, les milieux de cultures sont préparés à base d'eau de mer naturelle.

Partie 2

Etude des lipides de champignons  
de zones conchylicoles

## Partie 2- Etude des lipides de champignons des zones conchyliques

---

Depuis le dernier quart du 20<sup>ème</sup> siècle, l'importance cruciale pour l'homme des acides gras polyinsaturés, est largement reconnue compte tenu des fonctions biologiques qui leur sont associées. Les microorganismes cultivables à grande échelle représentent les meilleures pistes dans la recherche de sources alternatives de lipides et d'acides gras valorisables en santé et nutrition. Parmi celles-ci, les champignons, et plus particulièrement ceux isolés des zones conchyliques, pourraient représenter un réel intérêt dans ce domaine de recherche.

C'est donc une des ambitions de ce travail sur les micromycètes marins que d'évaluer leur capacité de production de lipides et d'acides gras potentiellement intéressants en santé et en nutrition humaine. Les acides gras seront examinés à la fois comme stockeurs d'énergie (lipides totaux ou triglycérides) et comme éléments structuraux basiques (phospholipides).

Avant d'exposer les résultats obtenus, une mise au point sur les lipides et acides gras est présentée ainsi qu'une synthèse des connaissances actuelles sur les acides gras fongiques.

## P2-I- Etude bibliographique

### I-1- Les lipides

#### I-1-1- Définition

Les lipides sont des molécules organiques qui ont pour caractéristique commune une hydrophobie prononcée. L'insolubilité dans l'eau, contrairement aux solvants organiques, est le critère de base permettant de regrouper des molécules très diverses, d'un point de vue structural, dans la famille des lipides. La majorité des lipides correspondent à des dérivés d'acides gras (AG) : on parle alors de lipides acylés.

Les lipides peuvent être classés selon deux approches, soit en fonction des caractères de la chaîne acyle, soit en fonction de leur polarité (Belitz et Grosch, 1987).

#### I-1-1-1- Classification selon les caractères de la chaîne acyle

Les lipides peuvent être classés en lipides simples, non saponifiables et lipides acylés, saponifiables.

##### I-1-1-1-1- Lipides simples (insaponifiables)

Les lipides simples regroupent les AG libres, les stérols, les caroténoïdes, les hydrocarbures, les terpènes et les tocophérols, les tocotriénols (vitamine E), les quinones isopréniques (vitamines K) et les alcools gras triterpéniques.

##### I-1-1-1-2- Lipides acylés

Les lipides acylés sont classés par famille : mono-, di- et triglycérides, phospholipides, glycolipides, polyalcools acylés, cires, esters de stérols, céramides.

#### I-1-1-2- Classification en lipides neutres et polaires

##### I-1-1-2-1- Lipides neutres

Les lipides neutres regroupent principalement les AG, les mono-, di- et triglycérides, les stérols et esters de stérols, les caroténoïdes, les cires, les tocophérols, les tocotriénols, les céramides.

##### I-1-1-2-2- Lipides polaires

Les lipides polaires renferment les sphingoglycolipides, les glycéroglycolipides, les gangliosides, les glycérophospholipides et les sphingophospholipides.

Au cours de ce travail, nous nous intéresserons principalement à l'étude des AG. Les AG sont des molécules très peu abondantes sous forme libre, qui se retrouvent majoritairement associés aux lipides de réserve, les triacylglycérides (ou triglycérides) et aux lipides membranaires, les phospholipides.

## I-1-2- Triglycérides

Les triglycérides (TG) sont des esters d'AG et de glycérol. Ils sont le constituant principal des huiles végétales et des graisses animales. Les TG ont pour rôle fondamental d'être une réserve d'énergie très importante. L'hydrolyse des TG par les lipases (ou lipolyse des triglycérides) est la première étape de l'utilisation des AG comme source d'énergie. Les AG libérés sont ensuite liés au coenzyme A et dégradés par oxydation dans les mitochondries, libérant des quantités importantes de molécules d'ATP. La formule chimique générale des TG est illustrée Figure 2-1.

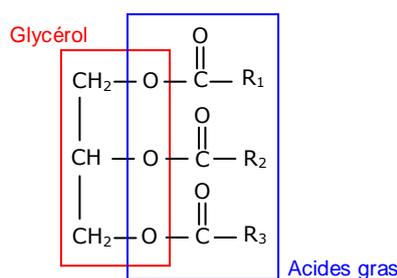


Figure 2-1 : Formule générale d'un triglycéride

$R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$  sont des chaînes alkyles. Les trois AG ne sont en général pas les mêmes et peuvent comporter de 4 à 22 atomes de carbone. Néanmoins, les AG les plus courants présentent des chaînes de 16 et 18 atomes de carbone. Des chaînes plus courtes se rencontrent dans les matières grasses animales alimentaires par exemple (acide butyrique). Généralement, les AG naturels comportent un nombre pair d'atomes de carbone compte tenu du fait qu'ils sont biosynthésés à partir de l'acide acétique.

La plupart des corps gras naturels sont constitués d'un mélange complexe de TG et vont fondre progressivement sur une large gamme de température.

Chez les organismes eucaryotes, la biosynthèse des TG a généralement lieu dans le réticulum endoplasmique. En effet, les enzymes impliquées dans la biosynthèse des TG y sont principalement localisés. En ce qui concerne les champignons, peu d'études relatent la synthèse des TG et la localisation exacte des enzymes impliquées dans la synthèse des TG reste encore incertaine. Toutefois, certaines publications concernant l'étude de la biosynthèse des TG chez les levures (Christiansen, 1978) et les plantes supérieures (Gurr *et al.*, 1974) ont rapporté que ces enzymes ne sont pas exclusivement localisées dans la fraction microsomale dérivant du réticulum endoplasmique mais également présentes dans les corps lipidiques. La biosynthèse des TG a également été étudiée dans les fractions subcellulaires d'un champignon oléagineux inférieur (*Mortierella ramanniana*) (Pillai *et al.*, 1998). Les auteurs ont suggéré que le processus de biosynthèse des TG chez cette espèce débutait dans les membranes du réticulum endoplasmique puis se poursuivait dans les corpuscules lipidiques, ceci en étudiant la distribution subcellulaire des enzymes impliquées dans la biosynthèse des TG.

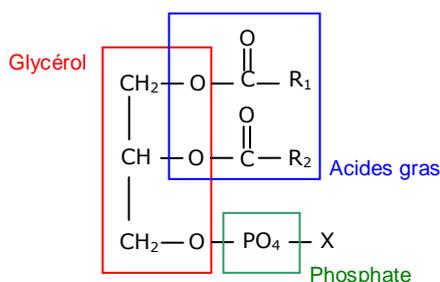
La biosynthèse des TG se divise en trois étapes et fait intervenir différentes enzymes :

- la première étape consiste en la formation du phosphate : les fonctions primaire et secondaire du glycérol 3-P sont estérifiées par l'intervention de la glycérol 3-phosphate acyl-transférase et de la lysophosphatidate acyl-transférase.
- la deuxième étape consiste en la déphosphorylation de l'acide phosphatidique : le groupement phosphate est hydrolysé par la phosphatidate phosphohydrolase pour donner un diglycéride ou diacylglycérol.
- lors de la dernière étape, il y a estérification de la dernière fonction alcool : le diglycéride réagit avec un acyl-CoA pour donner le TG par le biais de la diacylglycérol Acyl-CoA transférase.

Chez la plupart des organismes eucaryotes, les TG sont libérés dans le cytosol sous forme de gouttelettes lipidiques ou dans la lumière du réticulum endoplasmique. Chez les champignons, les TG sont accumulés dans des corpuscules lipidiques, huileux et des granules lipidiques, organelles similaires à ceux retrouvés chez les plantes (Pillai *et al.*, 1998).

### I-1-3- Phospholipides

Les phospholipides (PL) sont les principaux constituants des membranes cellulaires, ils ont donc un rôle fondamentalement structural. Les PL ont le même motif de base que les TG, ils se composent d'une molécule de glycérol estérifiée à deux AG et un phosphate (Figure 2-2). Le phosphate est également estérifié à un autre composé hydroxylé (souvent notée X : glycérol, choline, sérine, éthanolamine, inositol) qui varie selon les PL et en définit les grandes classes. Les PL se différencient ainsi selon leurs chaînes acyles (longueurs et nombre d'insaturations dans leur structure) et le dérivé phosphatidique (OPO4-X).



**Figure 2-2 : Structure générale d'un phospholipide**

Les PL sont des molécules amphiphiles. En effet, les PL présentent une affinité pour les composés polaires grâce à leurs têtes hydrophiles (groupe phosphate et groupe X) et pour les composés apolaires grâce à leurs queues hydrophobes (AG). Ainsi, dans l'eau, les PL peuvent s'organiser en micelles de manière à minimiser les contacts entre l'eau et leurs queues hydrophobes.

La synthèse des TG et celle des PL utilisent les mêmes étapes enzymatiques jusqu'au niveau du diacylglycérol. En ce qui concerne les PL, des réactions spécifiques permettent de fixer et d'identifier le groupement polaire X qui va déterminer la classe du PL.

## I-1-4- Les acides gras

### I-1-4-1- Généralités

Les AG, principaux constituants des lipides, sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe communément constituée de 4 à 28 carbones, principalement stockés dans les TG et associés aux PL et aux glycolipides. Les AG sont notés n:m, où n représente le nombre d'atomes de carbone et m est le nombre d'insaturations. En fonction de la longueur de chaîne, ils peuvent être divisés en cinq groupes : les AG volatils (< à 6 atomes de carbone), à chaîne courte (6-10), à chaîne moyenne (12-16), à longue chaîne (18-22) et à très longue chaîne (>22).

Les AG diffèrent donc par la longueur de la chaîne carbonée, mais aussi par le nombre, la position et la configuration (*cis/trans* ou *c/t*) des doubles liaisons.

La saturation de la chaîne carbonée va permettre une flexibilité importante due à la libre rotation de chaque liaison chimique du squelette. Le point de fusion des AG augmente avec la longueur de la chaîne carbonée : les AG à courte chaîne sont liquides à température ambiante contrairement à ceux à moyenne ou longues chaînes.

La présence de double(s) liaison(s) rend toute rotation entre les atomes impliqués impossible, la structure des AG insaturés (AGI) est donc plus rigide que celle des AG saturés (AGS). La configuration *cis* au niveau d'une double liaison génère un angle de  $\pm 30^\circ$  dans la chaîne aliphatique, alors que la configuration *trans* donne une conformation proche de la forme en extension des AGS. De façon générale, les AGI ont un point de fusion plus faible que leurs correspondants saturés. A température ambiante, ils sont huileux.

### I-1-4-2- Nomenclatures

Deux nomenclatures coexistent pour définir les AGI. La première, conformément à la réglementation internationale, propose d'indiquer la position de la première double liaison par la notation (n-x), en comptant x à partir du méthyle terminal, la chaîne acyle possédant n carbones. Pour les AG possédant deux ou plusieurs insaturations, cette nomenclature est valable uniquement pour les AG présentant des chaînes insaturées conventionnelles, c'est-à-dire avec les doubles liaisons séparées par un CH<sub>2</sub>. Ainsi, par exemple, l'acide 18:2 n-6 identifie un AG avec 18 atomes de carbone et deux insaturations dont la première est située entre les carbones C-6 et C-7 à partir du méthyle terminal (Ackman, 1989).

Remarque : Une autre notation, très prisée des biochimistes, consiste à remplacer (n-x) par  $\omega$ x. Si nous reprenons l'exemple précédent, l'acide 18:2 n-6 sera annoté 18:2  $\omega$ 6.

La deuxième nomenclature, alternative, localise les doubles liaisons à partir du carbone 1 du groupe carboxyle fonctionnel. Ainsi, l'acide 18:2 n-6 est alors désigné  $\Delta$ 9,12-18:2, le delta étant facultatif. Cette nomenclature est précieuse pour tous les AG dont les insaturations sont séparées par plus d'un groupe CH<sub>2</sub> tel que le  $\Delta$ 7,13,17-20:3, ou ne sont pas séparées (on parle alors de doubles liaisons conjuguées). C'est le cas, par exemple, de l'acide  $\Delta$ 9,11-18:2.

Remarque : Dans la suite du manuscrit, nous omettrons le symbole  $\Delta$  devant les doubles liaisons. Ainsi l'acide linoléique sera annoté 9,12-18:2, l'acide oléique 9-18:1, etc.

La configuration des doubles liaisons, très généralement *cis* (*Z*) dans les composés naturels, doit être précisée dans le cas d'une insaturation *trans* (*E*). La position d'une ramification (méthyle) ou d'une fonction (hydroxyle par exemple) est indiquée par le numéro du carbone sur lequel elle est fixée. Ainsi, par exemple, l'acide 10-Me-18:0 correspond à un AG constitué de 19 atomes de carbone dont l'un est porté par un groupement en position 10. Pour les AG présentant des ramifications proches du groupement terminal méthyle, notamment en avant-dernière position ou en antépénultième, les préfixes *iso* ou *anteiso* sont placés devant le nom de l'acide. Par exemple, l'acide 16:0 présentant un méthyle en position 14 (14-Me-15:0) sera noté *iso*-16:0, en position 13 (13-Me-15:0), *anteiso*-16:0.

Il est possible de voir, notamment pour les AG hydroxylés, une notation en lettres grecques à partir du carbone adjacent à celui de l'extrémité fonctionnelle. Ainsi, les AG hydroxylés en position 2 sont souvent nommés  $\alpha$ -OH-AG.

Par ailleurs, les AG possèdent la plupart du temps un nom commun lié à leur origine. Ainsi l'acide 16:0 est communément appelé acide palmitique en raison de sa forte proportion dans l'huile de palme, l'acide 9,12-18:2 ou 18:2 n-6, acide linoléique en référence à l'huile de lin, etc.

### I-1-4-3- Biosynthèse

Les AG à nombre pair de carbones ont pendant longtemps été considérés comme les seuls existants et la plupart des ouvrages de biochimie ne font référence qu'à la biosynthèse des AG pairs.

Pourtant, une grande variété d'AG impairs et/ou ramifiés a été décrite, bien que toujours minoritaires par rapport aux AG pairs, et principalement chez les bactéries. Ils correspondent ainsi à des biomarqueurs de choix, pouvant traduire la présence de bactéries lorsqu'ils sont retrouvés chez d'autres organismes. Par exemple, ils vont être présents dans les matières grasses du lait des ruminants, reflétant l'activité bactérienne ruminale (Massart-Lèen *et al.*, 1981; Massart-Lèen *et al.*, 1983). Ils ont également été identifiés parmi les AG des PL d'éponges marines, suggérant l'existence de symbioses entre éponges marines et bactéries (Barnathan *et al.*, 1993).

En ce qui concerne la biosynthèse des AG à nombre pair de carbones, elle s'effectue chez l'homme, dans le cytosol des cellules hépatiques et adipeuses à partir de l'acétyl-CoA. Ce dernier provient essentiellement de la dégradation des glucides, et correspond au précurseur unique des AG à nombre pair de carbones. De façon générale, la biosynthèse des AG pairs débute par la formation du malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA, réaction catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase. La chaîne des AG en croissance va ensuite s'allonger par l'addition séquentielle d'unités de 2 atomes de carbone, ceci par le biais d'un complexe multi-enzymatique, l'acide gras synthétase.

La biosynthèse d'AG impairs et ramifiés, contrairement à celle des AG pairs, va faire intervenir différents précurseurs comme les AG volatils (acides propionique et valérique) ou les chaînes carbonées ramifiées issues de la dégradation des acides aminés (valine, leucine, isoleucine).

### I-1-4-4- Sources naturelles

Les AG sont issus de tous les règnes du monde vivant. Nous reprendrons succinctement les principales sources d'AG saturés, monoinsaturés et polyinsaturés, en nous basant sur les travaux de Pryde (1979) et de Belitz et Grosch (1987).

L'acide laurique (12:0) est l'un des trois AGS les plus fréquemment rencontrés à l'état naturel avec l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0). Une des sources les plus riches d'acide laurique est l'huile de coprah. L'acide myristique (14:0) constitue 14 % des AG de la matière grasse du lait et 13 à 19 % de l'huile de coprah. L'acide palmitique est l'AGS le plus rencontré, présent dans pratiquement toutes les graisses végétales et animales, y compris dans les graisses des animaux marins. L'acide stéarique est également largement distribué, aussi bien chez les végétaux que chez les animaux. La plupart des huiles végétales en contiennent mais c'est le beurre de cacao qui en est le plus riche. Les AG à longues chaînes présentent une large distribution (cire de carnauba, huiles végétales) mais sont retrouvés dans des proportions beaucoup plus faibles en général.

Remarque : Bien que la plupart des AGS soient linéaires, de nombreux AG ramifiés ont été isolés en petites quantités de graisses animales de ruminants traduisant ainsi l'activité ruminale des bactéries.

Les AG à 18 carbone contenant 1, 2 ou 3 doubles liaisons constituent les AGI les plus importants des règnes végétal et animal ; ceux qui contiennent 4 ou plus de 4 doubles liaisons et de 20 à 24 atomes de carbone se rencontrent principalement dans les huiles de mammifères marins et de poissons.

Concernant les acides gras monoinsaturés (AGMI), c'est l'acide oléique (9-18:1) qui est le plus répandu, présent dans presque toutes les graisses végétales et animales et pouvant représenter plus de 50 % des acides gras totaux (AGT). Les sources importantes d'acide oléique sont les huiles d'olive, d'arachide, de pécan ou encore de carthame. L'acide palmitoléique (9-16:1) est largement représenté, constituant de presque toutes les catégories de plantes et d'animaux, des espèces les plus évoluées aux moins évoluées mais présent en quantités moindres que l'acide oléique. Il est le plus abondant dans les huiles animales d'origine marine (éponges et poissons) et en faible concentration dans la matière grasse du lait.

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) à moins de 18 atomes de carbone sont très minoritaires. Les AGPI les plus importants et les plus répandus sont l'acide linoléique (AL) (9,12-18:2) et l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA) (9,12,15-18:3). L'AL est l'AGPI le plus distribué et le plus abondant, présent dans la plupart des huiles végétales en forte proportion. L'ALA est également largement rencontré dans la nature, surtout comme composant majeur des huiles végétales hautement insaturées. L'huile de lin en contient plus de 50 %. L'acide eicosatétraénoïque, plus connu sous le nom d'acide arachidonique (ARA) (5,8,11,14-20:4) n-6 se rencontre majoritairement dans les graisses d'origine animale. Enfin, les acides gras polyinsaturés à plus de quatre doubles liaisons, tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (5,8,11,14,17-20:5) n-3, l'acide docosapentaénoïque (DPA) (7,10,13,16,19-22:5) n-3 ou l'acide docosahexaénoïque (DHA) (4,7,10,13,16,19-22:6) n-3 sont présents dans les huiles marines (huiles de hareng, de foie de morue, etc.).

### I-1-4-5- Rôles biologiques

Les AG présentent des rôles biologiques très importants. Ils sont considérés comme une bonne source énergétique, possédant des liaisons riches en énergie qui, lorsqu'elles sont rompues par action enzymatique, libèrent de l'énergie disponible pour les cellules. Comme nous l'avons déjà indiqué auparavant, mis en réserve sous forme de TG, ils constituent une importante réserve énergétique.

Les AG ont également un rôle structural majeur en intervenant dans la constitution des membranes cellulaires et en assurant la fluidité membranaire. En effet, au niveau des membranes, les AG des PL interagissent avec le cholestérol et garantissent une certaine fluidité membranaire. Ils participent également, au niveau membranaire, au maintien de l'équilibre entre les échanges intra- et extracellulaire en tant que médiateurs cellulaires.

Ils jouent également un rôle important dans la régulation du taux de cholestérol. La combinaison de TG et de cholestérol avec des protéines produit des lipoprotéines qui circulent dans le sang et fournissent des nutriments à l'organisme. Les lipoprotéines de basse densité (LDL) surnommées « mauvais cholestérol » vont transporter le cholestérol du foie vers les tissus qui en ont besoin. Il est donc normal que le sang en contienne un certain niveau. Par contre, en excès, les LDL peuvent causer une accumulation de cholestérol sur les parois artérielles, contribuer au développement d'athérosclérose par le durcissement des artères et provoquer des maladies coronariennes. Les lipoprotéines de haute densité (HDL), contrairement aux LDL contiennent moins de cholestérol et contribuent à diminuer l'excès de cholestérol des cellules et des parois artérielles en transportant le cholestérol vers le foie où il est éliminé. On parle alors de « bon cholestérol ».

Si certains AG sont considérés comme bénéfiques pour l'organisme, d'autres, surconsommés, peuvent provoqués des risques cardiovasculaires plus ou moins graves, directement associés à l'augmentation du taux des LDL. C'est le cas des AGS, présents en quantités importantes dans les graisses animales, et des AGI en position *trans*, obtenus lors des hydrogénations et retrouvés dans les graisses animales et les huiles végétales (Judd *et al.*, 1994; Kromhout *et al.*, 1995). Les AGS inhibent l'activité des récepteurs hépatiques aux LDL, réduisant leur épuraison dans le plasma et entraînant leur accumulation. Les AGI en *trans*, proches des AGS d'un point de vue conformation, augmentent les taux de LDL, diminuent ceux de HDL et sont étroitement liés aux maladies cardiovasculaires (Willett *et al.*, 1993; Niu *et al.*, 2005).

Inversement, les AGI en *cis* (mono et polyinsaturés des séries n-3, n-6 et n-9) vont être bénéfiques pour l'organisme, ils fluidifient les membranes et régulent le cholestérol en augmentant le taux des HDL et diminuant celui des LDL. Ils exercent ainsi une action préventive sur les maladies cardiovasculaires (Wahrburg, 2004; Lunn et Theobald, 2006).

### I-1-4-6- Notion d'acides gras essentiels

Un réel intérêt nutritionnel est donc porté sur ces AG bénéfiques pour l'organisme. Contrairement aux AGI de la série n-9, ceux des séries n-3 et n-6 ne peuvent être biosynthétisés chez l'homme à partir des AGS dans l'organisme et sont donc qualifiés d'essentiels, on parle alors d'AGE. Or, ces derniers interviennent dans la constitution des membranes cellulaires, sont impliqués dans la fluidité et la perméabilité membranaire ainsi que dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaire. Ils doivent donc être apportés par l'alimentation.

Les deux AG indispensables dans l'alimentation, l'AL et l'ALA, vont servir de précurseurs d'AGPI à longues chaînes des séries n-3, (EPA, DPA et DHA) et n-6 (ARA, DPA) qui sont impliqués dans la synthèse d'hormones eicosanoïdes comme les prostaglandines, lipoxines, leucotriènes et thromboxanes.

Remarque : les isomères de position des séries n-3 et n-6 existent pour le DPA. Comme nous l'avons dit précédemment, l'isomère n-3 est abondant dans les huiles marines. Toutefois, celui de la série n-6 peut également être rencontré dans les tissus animaux, et nous le verrons un peu plus loin, est surtout présent chez les microorganismes marins du groupe des Thraustochytrides.

Bien que les acides ARA, EPA, DPA et DHA soient produits dans l'organisme à partir du AL et du ALA, leur synthèse reste insuffisante et un apport régulier alimentaire est indispensable.

Il est important d'indiquer qu'un débat a lieu depuis plusieurs années sur la terminologie des AGE. Comme nous venons de le décrire, pour la plupart des biochimistes et des nutritionnistes, les AGE sont les

AG qui ne peuvent être biosynthétisés par l'organisme, ils correspondent donc aux acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique, précurseurs des AGPI de 20 et 22 carbones. Pourtant, ce sont ces AGPI qui leur succèdent qui vont avoir une réelle importance dans les processus physiologiques de l'organisme chez l'homme. Donc, de plus en plus de chercheurs considèrent aujourd'hui, en se basant sur les études nutritionnelles modernes, que définir l'AL et l'ALA comme AGE est dépassé, ces derniers pouvant être considérés comme dispensables. Arts et al. (2001) ont proposé comme définition aux AGE les AG à longues chaînes qui ne peuvent pas être synthétisés en **quantité suffisante** pour assurer leur **rôle physiologique de façon optimale**. Pour notre étude nous considérerons comme essentiel, dans une définition assez large, d'une part les AG non biosynthétisés par l'organisme (LA, ALA) mais aussi les AG qui en découlent (ARA, EPA, DHA).

Une carence en AGE provoque un certain nombre de problèmes comme une diminution de la vitesse de la croissance accompagnée d'une perte de poids, des troubles de la reproduction, de la coagulation, du système immunitaire, ou encore une déshydratation.

Il existe une compétition biologique entre les AG des séries n-3 et n-6, due à l'utilisation des mêmes enzymes pour le développement de leurs dérivés métaboliques. La consommation en excès de l'un ou de l'autre des deux AG précurseurs (AL et ALA) freine le métabolisme du plus faiblement représenté. Ainsi, par exemple la production d'ARA sera favorisée par un excès d'apport en LA au dépend des acides EPA et DHA. Aujourd'hui, les études montrent qu'il faut privilégier les AGPI de la série des n-3 dans l'alimentation par rapport à ceux des n-6 en respectant un rapport de 1 pour 5.

En effet, les « oméga-3 » ont été décrits comme bénéfiques dans les maladies cardiovasculaires et les maladies coronariennes (Singh *et al.*, 2002). Ils ont un effet préventif contre la thrombose, la formation des caillots sanguins, et la dégénérescence des parois internes des artères (Djoussé *et al.*, 2003a; Djoussé *et al.*, 2003b). Les « oméga-3 » sont également indispensables au développement du système nerveux et de l'acuité visuelle, aux mécanismes de la mémoire (Uauy *et al.*, 1990; Birch *et al.*, 1992a; Birch *et al.*, 1992b) et potentiellement intéressants dans la prévention de cancers de la peau (Black et Rhodes, 2006).

Des études épidémiologiques ont montré que l'alimentation occidentale est pauvre en « oméga-3 » et que le rapport 1 pour 5 n'est pas respecté, pouvant engendrer des déséquilibres métaboliques et l'émergence de pathologies (Blondeau et Schneider, 2006). Afin de rééquilibrer les apports en « oméga-3 » et « oméga-6 », une alimentation saine constituée de fruits, légumes, poissons gras, céréales et huiles est recommandée. Le Tableau 2-1 résume les sources principales d'AGE.

**Tableau 2-1 : Principales sources d'acides gras essentiels**

Famille des « oméga-6 »	9,12-18:2	Acide linoléique (AL)	Soja, lin, maïs, tournesol
	6,9,12-18:3	Acide $\gamma$ -linoléique (GLA)	Primevère, onagre, cassis, burrache, chanvre, spiruline
	5,8,11,14-20:4	Acide arachidonique (ARA)	Abats d'animaux (foie de porc), glandes surrénales
Famille des « oméga-3 »	9,12,15-18:3	Acide $\alpha$ -linoléique (ALA)	Soja, colza, sauge, lin, chanvre, noix
	5,8,11,14,17-20:5	Acide eicosapentaénoïque (EPA)	Poissons (hareng, sardine, foie de morue), microalgues
	7,10,13,16,19-22:5	Acide docosapentaénoïque (DPA)	Poissons ((hareng, sardine, foie de morue)
	4,7,10,13,16,19-22:6	Acide docosahexaénoïque (DHA)	Hareng, sardine, menhaden, Dinoflagellés, Thraustochytrides

Remarque : le GLA provient de la désaturation du AL, il intervient dans la voie de biosynthèse des AG de la série n-6 en tant que précurseur de l'ARA, nous pouvons donc, selon la définition que nous avons proposé un peu plus tôt, le considérer comme un AGE. Néanmoins, bien que précurseur et donc indispensable pour le bon développement de l'organisme, un apport alimentaire en ARA est préféré à un apport en GLA compte tenu du faible taux de conversion du GLA en ARA par la  $\Delta^6$ -désaturase lors de la voie de biosynthèse des « oméga-6 » (Ward et Singh, 2005).

Du fait de leur rôle essentiel chez les organismes eucaryotes, les AGPI, dont les « oméga-3 » et leurs dérivés, représentent des cibles nutritionnelles et pharmaceutiques très intéressantes. Un intérêt croissant s'est porté pour la recherche de nouvelles sources nutritionnelles d'AGE, notamment des AG à 20 et 22 carbones.

Actuellement, les sources principales les plus abondantes en AGPI à longue chaîne sont trouvées dans le milieu marin, chez les poissons et les coquillages (Bergé et Barnathan, 2005). Les organismes aquatiques sont en effet notre principale source d'AGE facilement accessible. Cependant, l'effet combiné de la surpêche mondiale, entraînant irrémédiablement un déclin des ressources halieutiques et d'une demande croissante, liée à l'accroissement de la population mondiale et à l'élargissement du champ des applications, risque de poser de sérieux problèmes, dans l'avenir, quant à l'accès à cette ressource.

Il s'est donc avéré indispensable de trouver des sources alternatives. Le choix principal s'est porté sur les organismes pouvant être cultivés et notamment les microorganismes pour lesquels les AG pouvaient être produits à l'échelle industrielle. Ainsi des sources d'AGE ont été rapportées des microorganismes tels que les microalgues, les dinoflagellés, les bactéries marines, les protozoaires et les champignons (Ward et Singh, 2005). Une attention particulière a également été apportée aux Thraustochytrides pour leur forte production de DHA. Nous y reviendrons ultérieurement.

## I-2- Lipides fongiques

Les champignons représentent, dans leur ensemble, des organismes très intéressants d'un point de vue lipidique. En effet, ils peuvent représenter des sources importantes de lipides, notamment à visée nutritionnelle, comme par exemple les AGE, mais également des lipides à visée pharmacologique comme les stérols et les glycolipides. Nous allons donc, dans ce chapitre, nous intéresser plus particulièrement aux champignons en tant que « producteurs de lipides », en réalisant un tour d'horizon sur ce que peut fournir le règne fongique.

Nous essaierons ainsi de montrer l'intérêt que peuvent apporter les champignons d'une façon générale sur l'étude des lipides puis plus spécifiquement sur celles des AG.

### I-2-1- Mise au point sur les lipides des champignons

Les champignons représentent un réel intérêt compte tenu du fait que certains d'entre eux, cultivables, peuvent produire des fractions lipidiques très intéressantes par rapport à d'autres organismes comme les végétaux ou les organismes marins. Il n'est pas rare de rencontrer, chez certaines espèces cultivées, une proportion de lipides pouvant dépasser 25% en poids de la biomasse. Ces organismes sont alors considérés comme des organismes oléagineux (Murphy, 1990) au même titre que, par exemple, les principales graines exploitées pour les huiles alimentaires.

Deux revues de référence, publiés en 1975 (Brennan *et al.*) et 1988 (Lösel) ont répertorié tous les travaux concernant l'étude des lipides de champignons depuis les années 1950. Ces travaux offrent une mise au point sur les lipides de champignons, en s'intéressant aussi bien à leur production qu'à leur composition lipidique (AG, stérols, glycolipides, PL). Nous nous attarderons principalement sur les stérols et les glycolipides, les AG seront abordés plus spécifiquement dans la section suivante.

#### I-2-1-1- Stérols fongiques

La plupart des champignons synthétisent des stérols. Ces derniers sont retrouvés sous forme libre, d'ester, de glycosides de stérols ou d'autres formes combinées. Le métabolisme des stérols chez les champignons a attiré considérablement l'attention (Brennan et Roe, 1975), tout d'abord pour leur rôle dans la reproduction et la morphogenèse des champignons, mais aussi pour l'intérêt industriel des champignons en tant que source d'ergostérol, point de départ de nombreuses voies de biosynthèses stéroïdiennes dont notamment celle de la vitamine D2.

L'ergostérol est l'un des stérols fongiques les plus distribués, présent chez la plupart des Eumycètes (Zygomycètes, Ascomycètes et Basidiomycètes) et qui peut être utilisé comme biomarqueur de champignons dans les sols tempérés (Ruzicka *et al.*, 2000).

Nous citons ici quelques travaux décrivant la présence d'ergostérol chez les champignons. L'ergostérol a été isolé de champignons inférieurs comme *Absidia corymbifera*, (Zygomycète) (Batrakov *et al.*, 2004) où il représente 5% des lipides totaux. Il a également été isolé de champignons pathogènes de plantes comme *Leptosphaeria maculans*, un ascomycète où il représente 95% de la composition stérolique et 1,7% de la biomasse sèche (Griffiths *et al.*, 2003a). L'ergostérol a également été décrit chez des espèces marines d'Ascomycètes comme *Corollospora lacera* (MacKenzie *et al.*, 2004) ou des champignons isolés de marais salants méditerranéens tels que *Alternaria* sp. et *Cladosporium* sp. (Mejanelle *et al.*, 2000). Les Basidiomycètes en possèdent également comme le champignon de Paris (*Agaricus bisporus*,

Agaricaceae) où il représente 21% des lipides totaux (Bonzom *et al.*, 1999) ou encore, la Pleurote en forme d'huître (*Pleurotus ostreatus*, Pleurotaceae) (Chobot *et al.*, 1997).

En plus de l'ergostérol, d'autres stérols, dérivés ou non de l'ergostérol ont été décrits chez les champignons. Par exemple, chez plusieurs mycorhizes, le 24-éthylcholestérol a été identifié jusqu'à 85% de la composition en stérols alors que l'ergostérol était absent (Grandmougin-Ferjani *et al.*, 1999) et de nouveaux stérols ont été découverts chez certaines espèces comme *Agaricus blazei* (Agaricaceae) (Hirotani *et al.*, 2000) ou *Lactarium volemus* (Russulaceae) (Yue *et al.*, 2001).

Récemment, des nouvelles structures stéroliques ont été isolées à partir d'une espèce marine de *Penicillium* et ont la particularité d'être cytotoxiques sur cellules cancéreuses humaines de foie (Sun *et al.*, 2006).

Tous ces travaux montrent que les stérols fongiques représentent une famille moléculaire très diversifiée et potentiellement intéressante d'un point de vue pharmacologique.

## I-2-1-2- Glycolipides fongiques

De nombreuses publications ont également fait l'objet de description de glycolipides variés et originaux chez les champignons appartenant aussi bien aux Siphomycètes (champignons inférieurs) qu'aux Septomycètes (supérieurs).

L'équipe de Batrakov s'est principalement intéressée aux champignons inférieurs appartenant aux zygomycètes. Plusieurs glycolipides ont en effet été isolés à partir de culture d'*Absidia corymbifera* (Batrakov *et al.*, 2001; Batrakov *et al.*, 2003) et de *Mortierella alpina* (Batrakov *et al.*, 2002).

Des glycolipides ont également été isolés de moisissures appartenant aux Ascomycètes comme par exemple d'espèces de *Fusarium* (Duarte *et al.*, 1998) ou des champignons pathogènes comme *Aspergillus fumigatus*, *A. versicolor* et *Paracoccidioides brasiliensis* (une levure) (Villas Boas *et al.*, 1994; Toledo *et al.*, 1999). En ce qui concerne le genre *Aspergillus*, les premières publications concernant des glycolipides remontent aux années 1970 et font référence aux travaux de l'équipe de Brennan sur *Aspergillus niger* (Laine *et al.*, 1972; Brennan et Roe, 1975; Byrne et Brennan, 1976).

Les Basidiomycètes ont aussi fait l'objet d'études sur les glycolipides (Mizushina *et al.*, 1998; Qi *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2001). S'agissant de l'environnement marin, des glycolipides ont également été décrits chez des champignons marins (Keusgen *et al.*, 1996).

Cette famille lipidique est d'autant plus intéressante qu'elle comprend des molécules biologiquement actives impliquées dans les mécanismes de reconnaissance cellulaire, de signalisation transmembranaire ou encore, de croissance et de différenciation cellulaire.

D'ailleurs, certaines molécules isolées de champignons ont montré des activités biologiques intéressantes comme les cérébrosides isolés du Basidiomycète *Ganoderma lucidum* qui inhibent l'activité des ADN polymérases ou encore, les termitomycesphines isolés du champignon comestible *Termitomyces albuminosus* qui induisent la différenciation neuronale des cellules PC12 de rat (Qi *et al.*, 2000).

L'intérêt biochimique et pharmacologique des glycolipides, associé à une considérable diversité de molécules d'origine fongique, font donc des champignons une mine inépuisable de structures originales et potentiellement intéressantes.

## I-2-2- Acides gras fongiques

Comme nous l'avons dit précédemment, un intérêt croissant est apparu pour rechercher des microorganismes cultivables potentiellement producteurs d'AGE à l'échelle industrielle et ce dès les années 1980. Suivant cet objectif d'investigation, les champignons s'avèrent représenter une source intéressante et importante de lipides originaux à haute valeur nutritionnelle tels que les AGE.

De nombreuses espèces ont ainsi été explorées, balayant la totalité du règne fongique, des champignons « aquatiques » (Mastigomycotina), comprenant les Chytridiomycètes et les Oomycètes, aux champignons « vrais » ou Eumycètes regroupant les Zygomycètes, Ascomycètes et Basidiomycètes (*cf.* page 6).

Les travaux de Brennan *et al.* (1975) et de Lösel (1988) ont permis de montrer que, comme les autres organismes vivants, les champignons sont constitués, de façon générale, majoritairement par les acides palmitique (16:0), palmitoléique (16:1), oléique (18:1) et linoléique (18:2). Par ailleurs, les auteurs ont aussi constaté que la plupart des champignons inférieurs (Chytridiomycètes, Oomycètes et Zygomycètes) sont caractérisés par la présence importante d'AGPI contrairement aux champignons supérieurs (Ascomycètes et Basidiomycètes) pour lesquels, seules certaines espèces présentent uniquement l'ALA, précurseur biosynthétique de la voie des « oméga-3 ».

Les travaux publiés par Stahl (1996) relatifs à la caractérisation des champignons par l'étude de leur composition en AG corroborent ces études. La composition en AG d'une centaine de champignons filamenteux appartenant aux Oomycètes, Zygomycètes, Ascomycètes et Basidiomycètes a ainsi été étudiée. Les champignons étudiés présentent les mêmes AG mais avec des proportions différentes. Aucun des champignons appartenant aux Ascomycètes et Basidiomycètes étudiés dans cette étude ne contiennent d'AGPI contrairement aux Oomycètes et aux Zygomycètes.

Ainsi, ce sont surtout les champignons inférieurs qui se sont révélés intéressants en tant que source alternative d'AGE potentiellement valorisable à l'échelle industrielle. Le Tableau 2-2, page suivante, recense les principales études publiées sur les AGE produits par les champignons depuis la fin des années 60 et la découverte du DHA produit par les Thraustochytrides.

Six AGE ont été mis en évidence chez les champignons inférieurs, trois appartenant à la série n-6, le GLA, l'ARA, et le DPA et deux à la série n-3, l'EPA et le DHA. Le DPA n-3 est très peu présent chez les champignons contrairement aux organismes marins.

Cette compilation d'études révèle certaines spécificités propres à chaque groupe fongique. Ainsi, les Chytridiomycètes et plus particulièrement les Thraustochytrides (genres *Thraustochytrium* et *Schyzochytrium*), sont les seuls organismes fongiques à produire du DHA et dans des proportions pouvant atteindre 50% des AG totaux comme c'est le cas pour *T. aureum* où les proportions lipidiques de la biomasse sont comprises entre 15 et 20% (Bajpai *et al.*, 1991a; Bajpai *et al.*, 1991b; Iida *et al.*, 1996). Ces organismes produisent également de l'EPA et du DPA mais dans des proportions moindres.

Tableau 2-2 : Acides gras essentiels d'origine fongique

Groupes et espèces	Série n-6			Série n-3			
	GLA	ARA	DPA	EPA	DPA	DHA	
<b>Chytridiomycètes</b>							
<i>Dermocystidium</i> sp.				+		(Ellenbogen <i>et al.</i> , 1969)	
<i>Thraustochytrium aureum</i>			+	+	+	(Ellenbogen <i>et al.</i> , 1969) (Kendrick et Ratledge, 1992) (Bajpai <i>et al.</i> , 1991a; Bajpai <i>et al.</i> , 1991b; Li et Ward, 1994; Iida <i>et al.</i> , 1996)	
<i>Thraustochytrium roseum</i>			+	+	+	(Ellenbogen <i>et al.</i> , 1969) (Kendrick et Ratledge, 1992) (Li et Ward, 1994; Singh et Ward, 1996)	
<i>Thraustochytrium striatum</i>					+	(Li et Ward, 1994)	
<i>Thraustochytrium</i> sp.			+	+	+	(Singh <i>et al.</i> , 1996; Burja <i>et al.</i> , 2006)	
<i>Schizochytrium aggregatum</i>				+	+	(Ellenbogen <i>et al.</i> , 1969; Kendrick et Ratledge, 1992)	
<i>Schizochytrium limacinum</i>			+		tr.	+	(Yokochi <i>et al.</i> , 1998; Zhu <i>et al.</i> , 2007)
<i>Schizochytrium</i> sp.			+			+	(Nakahara <i>et al.</i> , 1996; Yaguchi <i>et al.</i> , 1997)
<b>Oomycètes</b>							
<i>Achlya</i> sp.		+		+			(Aki <i>et al.</i> , 1998)
<i>Pythium debarianum</i>		+		+			(Solov'eva <i>et al.</i> , 1997)
<i>Pythium irregulare</i>		+		+		+	(Cheng <i>et al.</i> , 1999) (O'Brien <i>et al.</i> , 1993)
<i>Pythium ultimum</i>		+		+			(Gandhi et Weete, 1991; Stredansky <i>et al.</i> , 2000a)
<i>Saprolegnia parasitica</i>		+		+			(Kendrick et Ratledge, 1992)
<b>Zygomycètes</b>							
<i>Absidia corymbifera</i>	+						(Konova <i>et al.</i> , 2002)
<i>Conidiobolus nanodes</i>		+					(Kendrick et Ratledge, 1992)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	+						(Gema <i>et al.</i> , 2002)
<i>Cunninghamella elegans</i>	+						(Conti <i>et al.</i> , 2001)
<i>Cunninghamella japonica</i>	+						(Emelyanova, 1996)
<i>Entomophthora exitalis</i>							(Kendrick et Ratledge, 1992)
<i>Mortierella alliacea</i>		+					(Aki <i>et al.</i> , 2001)
<i>Mortierella alpina</i>	+	+		+			(Jang <i>et al.</i> , 2005) (Bajpai <i>et al.</i> , 1991c) (Zhu <i>et al.</i> , 2002; Zhu <i>et al.</i> , 2004)
<i>Mortierella alpina-peyron</i>		+					(Kendrick et Ratledge, 1992)
<i>Mortierella elongata</i>		+					(Yamada <i>et al.</i> , 1987; Cheng <i>et al.</i> , 1999)
<i>Mucor inaequisporus</i>	+						(Emelyanova, 1997)
<i>Mucor rouxii</i>	+						(Somashekar <i>et al.</i> , 2001; Somashekar <i>et al.</i> , 2003)
<i>Thamnidium elegans</i>	+						(Stredansky <i>et al.</i> , 2000b; Certík <i>et al.</i> , 2006)

tr. : trace

**Remarque :** Les Thraustochytrides sont aujourd'hui considérés comme des protistes fungoïdes appartenant à la classe des Labyrinthulidomycètes. Néanmoins, on peut toujours les qualifier d'organismes inférieurs par rapport aux champignons supérieurs, étant constitués de filaments non septés. Pour des raisons de commodité, nous considérerons les Thraustochytrides selon leur ancienne classification, c'est-à-dire comme appartenant aux Chytridiomycètes.

Il est intéressant de remarquer que les sources d'AG recherchées pour certains additifs alimentaires chez les enfants en bas âge doivent être riches en DHA et si possible très peu enrichies, voire exemptes de EPA (Bowles *et al.*, 1999; Henderson, 1999).

Les Oomycètes, eux, sont souvent caractérisés par la présence à la fois d'ARA et d'EPA. Certaines espèces se sont montrées très intéressantes comme *Pythium irregulare*, *Achlya* sp. ou *Saprolegnia parasita*. Concernant cette dernière, l'ARA et l'EPA sont majoritairement présents dans les PL où ils représentent environ 40% de la composition en AG (Kendrick et Ratledge, 1992).

Enfin, les Zygomycètes vont surtout représenter des sources d'AG de la série n-6. Certains genres produisent exclusivement du GLA comme *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mucor* ou *Thamnidium*. Les Zygomycètes sont surtout reconnus pour leur production d'ARA avec des espèces comme *Mortierella alpina*, *Conidiobolus nanodes* ou *Entomophthora exitalis*. *M. alpina* correspond à l'espèce la plus intéressante avec des taux d'ARA pouvant dépasser 50% en fonction des conditions de cultures employées (Jang *et al.*, 2005).

Les champignons supérieurs (Ascomycètes et Basidiomycètes) sont moins connus pour produire des AGPI essentiels comme c'est le cas pour les Oomycètes et les Zygomycètes. Néanmoins quelques études ont montré que certaines espèces d'Ascomycètes (levures et moisissures) pouvaient, en fonction de la source de carbone utilisée dans le milieu de culture, produire des AGE tels que le GLA (Pohl *et al.*, 1997).

Les AG s'avèrent intéressants à étudier compte tenu, d'une part, qu'ils sont étroitement associés aux processus physiologiques et biochimiques essentiels et, d'autre part, qu'ils peuvent présenter de fortes potentialités pharmacologiques.

Comme nous venons de le voir, les champignons se sont révélés correspondre à de bonnes sources d'AGE (GLA, ARA et EPA). En ce qui concerne les sources d'AGE dans les écosystèmes marins, ce sont principalement les invertébrés, les algues et les poissons qui ont été valorisés et, mis à part l'étude de la production de DHA par les Thraustochytrides, les travaux concernant les AG chez les champignons marins sont encore rares.

La notion de champignons marins demeure d'ailleurs sujette à débat et les recherches se sont principalement focalisées sur la découverte de nouveaux champignons, la diversité géographique ou encore, le rôle écologique de ces organismes dans les écosystèmes marins.

Les champignons marins ont également intéressé les chercheurs pour leur fort potentiel de production de métabolites secondaires originaux. En effet, de plus en plus de structures nouvelles sont isolées et décrites à partir des champignons marins et pourraient représenter les molécules thérapeutiques de demain (Bhadury *et al.*, 2006).

Néanmoins, ce qui est vrai pour les métabolites secondaires l'est beaucoup moins pour les AG. En effet, très peu de travaux relatifs à l'étude des lipides et plus particulièrement des AG de champignons marins ont été entrepris. Les travaux de Block (1973) relatifs à l'étude de la composition en AG des triglycérides (AGTG) des espèces marines supérieures *Corollospora maritima* et *Zalerion maritimum*, de Cooney (1993) sur les AG totaux (AGT) d'une série d'Ascomycètes et de Deutéromycètes marins ou encore de Ravishankar (1994) sur l'Ascomycète *Cirrenalia pygmea* ont montré des compositions proches de celles des champignons terrestres c'est-à-dire, une prépondérance des acides palmitique, oléique et linoléique et de faibles proportions d'AGPI à 20 carbones des séries n-3 et n-6.

A notre connaissance, il s'agit là des principales publications qui ont porté sur l'étude des AG de champignons marins et ce domaine de recherche est appelé à un approfondissement dans l'avenir.

## P2-II- Méthodologies utilisées

### II-1- Production de la biomasse fongique

#### II-1-1- Mise en culture des souches sur milieu solide

Les champignons ont été cultivés sur milieu solide DCA pendant 10 jours, à 27°C sur boîte de Petri de 20 cm (125 mL de milieu) pour permettre une production de biomasse suffisante. Après avoir préparé les milieux de culture et stérilisé les boîtes de Petri, les cultures sont ensemencées, dans des conditions aseptiques (hotte à flux laminaire), à partir de stocks de culture conservés en chambre froide. En fonction des souches étudiées, nous avons procédé de manière différente pour l'ensemencement des milieux.

Les études de la production lipidique ont débuté par l'analyse de la souche de référence *Trichoderma longibrachiatum* MMS 151 qui était déjà identifiée et dont les paramètres de cultures étaient bien contrôlés. C'est d'ailleurs chez cette souche que les productions lipidiques et les compositions en AG ont été comparées par cultures en milieu liquide et solide.

##### II-1-1-1- Mise en culture des *Trichoderma*

Les *Trichoderma* sont des champignons se développant en envahissant très rapidement la totalité de la surface gélosée. Comme nous l'avons vu précédemment, leur développement se réalise par une alternance de croissance mycélienne et de sporulation qui est responsable de la formation de zones concentriques claires (représentant la croissance mycélienne) et plus foncées (liées à la sporulation du champignon).

De ce fait, l'inoculation des boîtes de Petri par simple impact à l'aide de pipettes Pasteur suffit pour amorcer l'étape de production de biomasse. Trois impacts par boîte ont été réalisés.

##### II-1-1-2- Mise en culture des *Penicillium*

Les *Penicillium* étudiés se comportent différemment des *Trichoderma*, leur développement est beaucoup plus lent sur la surface gélosée. Un ensemencement par trois impacts comme pour les *Trichoderma* ne suffirait donc pas à permettre la formation d'un « tapis » fongique recouvrant toute la surface de la gélose. Pour cela, nous avons pratiqué une inoculation par étalement de 1 mL d'une suspension de spores (100 000 spores/mL) sur toute la surface de la gélose, chaque spore germant donnant une colonie.

#### II-1-2- Mise en culture sur milieu liquide

Afin d'entreprendre une comparaison des procédés de fermentation (milieux gélosés et liquides), des mises en cultures en milieu liquide ont également été réalisées. Pour cela, après avoir procédé à une pré-étape de culture solide sur milieu DCA pour effectuer la suspension de spores, les flacons contenant les milieux liquides ont été ensemencés à raison d'une concentration finale de 500 000 spores/mL puis mis à incuber pendant 10 jours en milieu GLP.

Ce milieu a été choisi en référence aux travaux de Villas Boas *et al.* (1994) qui ont utilisé cette composition pour la production de glycolipides par des souches d'*Aspergillus*. La période d'incubation retenue est de 10 jours, basée sur deux études. La première concerne l'étude de la composition en AG de plusieurs espèces du genre *Penicillium* (Lopes da Silva *et al.*, 1998) où les périodes d'incubation correspondaient à 10 jours. La seconde, relative à l'accumulation des lipides chez des espèces de *Trichoderma* (Serrano-Carreón *et al.*, 1992a), a montré que les rendements lipidiques sont maximaux entre 9 et 11 jours d'incubation.

## II-2- Obtention des lipides totaux

### II-2-1- Récupération de la biomasse sur milieu solide

La biomasse fongique est récupérée à la surface des boîtes de Petri de deux façons différentes selon les souches étudiées.

#### II-2-1-1- Souches de *Trichoderma*

Pour les souches de *Trichoderma*, dont le mycélium se fragmente assez facilement sur la surface de la gélose, la biomasse (mycélium et conidies) est récupérée directement par grattage à l'aide d'une anse incurvée en forme de râteau.

#### II-2-1-2- Souches de *Penicillium*

Pour les souches de *Penicillium*, dont le mycélium ne croît pas en cercles concentriques mais plutôt en amas de colonies, la biomasse est récupérée directement par décollage du mycélium de la gélose à l'aide d'un scalpel puis est hachée avant de procéder à l'extraction.

### II-2-2- Arrêt des cultures en milieu liquide

Les cultures en milieu liquide sont stoppées par filtration. La biomasse, qui correspond dans ce cas au mycélium, est séparée du jus de fermentation par filtration sur Büchner avant l'étape extractive des lipides.

### II-2-3- Extraction des lipides

De nombreuses études ont été entreprises pour optimiser l'extraction des lipides totaux à partir de tissus animaux et végétaux. La méthode que nous avons adoptée consiste en l'extraction des lipides totaux par macération de la biomasse fongique dans un mélange de solvants organiques à température ambiante.

Le mélange chloroforme/méthanol était jusqu'à présent le plus couramment utilisé pour ce type d'extraction. En effet, il est très efficace pour récupérer rapidement la quasi totalité des lipides (Folch *et al.*, 1957), (Bligh et Dyer, 1959) et l'utilisation conjointe du chloroforme et du méthanol permet d'accéder aussi bien aux lipides neutres (chloroforme) qu'aux lipides polaires (méthanol) en formant un système ternaire (chloroforme/méthanol/eau) biphasé.

Ce mélange, grâce au méthanol, facilite l'accès aux constituants des membranes cellulaires par rupture de diverses liaisons comme les liaisons faibles de type associations hydrophobes de Van der Waals (entre lipides neutres et complexes ou entre lipides et parties hydrophobes des protéines), les liaisons hydrogènes et les associations électrostatiques (entre lipides polaires et protéines) mais aussi les liaisons fortes comme les liaisons covalentes (AG liés aux esters, aux amides ou aux glycosides). L'utilisation du méthanol a également l'avantage d'éviter toute dégradation enzymatique qui pourrait avoir lieu au cours des macérations (Kates, 1986).

En ce qui concerne l'extraction des lipides fongiques, Somashekar *et al.* (2001) ont montré que le mélange chloroforme/méthanol 2:1 (v/v) était plus efficace pour l'extraction des lipides totaux des différents champignons étudiés par rapport au mélange hexane/isopropanol et à l'hexane (extraction au Soxhlet).

Dans notre étude, bien que le chloroforme soit considéré comme le solvant le plus adéquat pour l'extraction des lipides totaux, nous l'avons remplacé, en raison de sa toxicité, par du dichlorométhane, molécule organochlorée relativement proche, nous permettant de pratiquer un épuisement de la biomasse en lipides.

#### **Protocole d'extraction des lipides totaux**

La biomasse fongique est mise à macérer sous agitation pendant 2 h dans un mélange dichlorométhane/méthanol (1:2, v/v). La phase organique est séparée de la biomasse par filtration sur Büchner, puis la biomasse est remise à macérer sous agitation pendant 2 h dans le mélange dichlorométhane/méthanol (2:1, v/v) à température ambiante. La deuxième phase organique est filtrée et jointe à la première pour donner un mélange final dichlorométhane/méthanol 1:1 (v/v). La phase organique est ensuite lavée plusieurs fois à l'eau distillée pour éliminer les sels minéraux, séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée à sec à l'évaporateur rotatif pour donner les lipides totaux.

## **II-2-4- Evaluation de la quantité de biomasse produite et de la proportion lipidique**

La biomasse fongique produite pour chaque culture est évaluée indirectement par addition de la masse sèche délipidifiée résultant de la double extraction lipidique et de la masse de l'extrait des lipides totaux. Bien qu'il ne s'agisse que d'une estimation, cette méthodologie nous donne une valeur minimale approchée et, en procédant toujours ainsi, on a alors un moyen de comparaison des productivités des différentes souches étudiées.

Dans un but de comparaison, on pourra alors exprimer la quantité de biomasse produite par litre de culture de milieu gélosé. La proportion des lipides par rapport à la biomasse (ou masse sèche) correspond au rapport poids à poids (pds/pds) de l'extrait en lipides totaux sur la biomasse selon la formule :

$$\% \text{ lipides} = \text{lipides totaux} / (\text{lipides totaux} + \text{masse sèche délipidifiée}).$$

Remarque : Pour les souches de *Trichoderma*, la quantité d'extrait lipidique est évaluée après soustraction de la proportion massique représentée par la présence des peptaïbols dans les extraits organiques obtenus après macération de la biomasse.

## II-3- Séparation des lipides en classes

La méthode choisie est une méthode empirique très utilisée pour séparer les lipides en classes et qui est, fondamentalement, une chromatographie d'adsorption effectuée à pression atmosphérique.

La phase stationnaire est de la silice qui, au contact d'un solvant, gonfle pour former un gel. Le gel ainsi obtenu est déposé dans la colonne de verre dont les dimensions sont choisies selon la masse de produit à déposer. Généralement, pour ce type de séparation, la quantité de silice pesée doit être de 20 à 25 fois plus importante que celle de l'extrait à déposer. Il est également important d'essayer de respecter, en fonction des quantités de produits déposés, une hauteur de gel de 30 cm pour un diamètre de 2 cm, de façon à garantir suffisamment d'échanges entre les phases stationnaire et mobile.

Après avoir tassé le gel de silice dans la colonne, l'extrait lipidique, en solution, est déposé délicatement sur le haut de la colonne. Le principe de cette chromatographie consiste à éluer les produits par différents solvants ou mélange de solvants. Il est également possible de réaliser un gradient d'élution, de polarité croissante pour une phase stationnaire polaire. Trois solvants purs de polarité croissante sont successivement utilisés pour la phase mobile.

Une autre façon de procéder, plus ancienne, proposée par Carroll en 1968 (Kates, 1986) nous a inspirés. Cette méthode classique générale faisait intervenir le chloroforme, l'acétone et le méthanol et des mélanges d'éluants intermédiaires : chloroforme/acétone (1:1, v/v) entre le chloroforme et l'acétone, et le chloroforme/méthanol (9:1 puis 1:1, v/v) entre l'acétone et le méthanol.

Dans notre cas, les trois solvants successivement utilisés sont respectivement le dichlorométhane, l'acétone et le méthanol en simplifiant cette méthode par l'élimination des mélanges d'éluants intermédiaires (Figure 2-3).

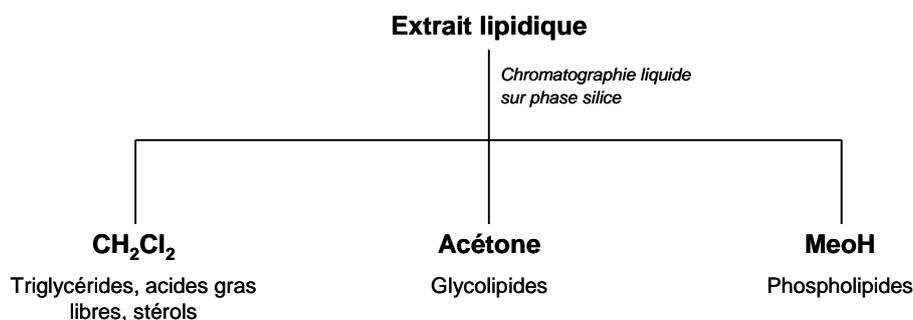


Figure 2-3 : Schéma général de séparation des lipides en classes

Le dichlorométhane, en remplacement du chloroforme (là encore pour des raisons de toxicité), joue pleinement un rôle d'éluant et permet ainsi l'élution et un certain degré de séparation des pigments, des hydrocarbures, des lipides non ou peu polaires comme par exemple les TG, les AG libres, les stérols et, si il y a lieu, les monoéthers de glycérol. L'acétone permet principalement l'élution des lipides plus polaires appartenant à la famille des glycolipides et autres dérivés glycoconjugués. D'autres métabolites, n'appartenant pas aux lipides, comme par exemple les alcaloïdes peuvent, parfois, être élués dans cette fraction. Enfin, le méthanol est utilisé pour récupérer les PL.

Le passage d'un solvant à un autre s'effectue lorsque plus aucun composé n'est entraîné par le solvant précédent. L'analyse contrôle par chromatographie sur couche mince (CCM) des fractions

récoltées, en présence de composés témoins, facilite le suivi de la séparation. Elle permet également d'apprécier, sous forme d'un spot, leur degré de pureté. Le principe consiste à déposer la fraction à analyser sur une plaque de CCM (ou phase stationnaire) qui est ensuite placée verticalement dans une cuve saturée par la vapeur d'un solvant de migration (ou phase mobile) qui, en progressant sur la plaque CCM par capillarité, entraîne avec lui les différents constituants du produit analysé selon leurs affinités (Bobbitt *et al.*, 1972). Il y a ainsi partage spécifique entre phase stationnaire et phase mobile. La phase stationnaire que nous avons utilisée est un gel de silice (sur plaque d'aluminium).

### Révélateurs CCM

La détection des constituants est faite à l'aide de deux principaux révélateurs caractéristiques des différentes classes chimiques. Le premier correspond à la vanilline sulfurique, réactif qui détecte la présence de quasiment toute substance organique. On l'utilise couramment pour la détection des fonctions alcools et phénols des terpènes, des stéroïdes et des huiles essentielles. Le deuxième révélateur, le réactif à l'orcinol, réagit en milieu acide avec les sucres, les molécules glycoconjuguées (glycolipides et gangliosides) et les sulfolipides.

### Témoins CCM et phases mobiles

Les fractions dichlorométhane sont analysées en comparaison avec un mélange cholestérol/acétate de cholestérol, par une élution hexane/diéthyl éther/acide acétique (50:50:1, v/v/v). Les fractions acétone sont analysées en présence de galactocérebrosides témoins (Sigma) par une élution dichlorométhane/méthanol (85:15, v/v) et les fractions méthanol par une élution dichlorométhane/méthanol (80:20 à 70:30, v/v) en présence de phospholipides témoins (Sigma).

## II-4- Etude des acides gras

La composition en AG a été étudiée dans les trois groupes : lipides totaux, TG et PL. L'étude des AG des lipides totaux apporte des informations globales sur la composition en AG des champignons étudiés et permet un bilan utile vis-à-vis d'une valorisation biotechnologique éventuelle. L'analyse de la composition des TG, renseigne, elle, sur les AG qui seront préférentiellement stockés dans l'organisme en tant que lipides de réserve. Enfin, l'étude des AG des phospholipides (AGPL) renseigne sur la structure des membranes lipidiques, faisant intervenir la notion de lipides de structure.

### II-4-1- Obtention des acides gras

#### II-4-1-1- Acides gras des lipides totaux et des triglycérides

Les AG des lipides totaux (comprenant principalement TG, esters de stérols, glycolipides et PL), ainsi que ceux des TG, sont extraits par saponification permettant d'accéder d'une part aux fractions insaponifiables, et d'autre part aux AG, présents dans la fraction saponifiable sous forme de sels RCOOK et qui seront ensuite estérifiés après passage aux acides RCOOH.

### Protocole de saponification

L'extrait lipidique est saponifié par de la potasse éthanolique (2 mol/L) afin de libérer les acides sous forme de sels (environ 100 mg d'extrait est porté au reflux pendant 2 h avec 6 mL de potasse éthanolique). Après refroidissement, le mélange réactionnel est versé dans 30 mL d'eau et extrait trois fois à l'hexane. La phase hexanique, correspondant à la fraction insaponifiable, est séchée sur sulfate de sodium anhydre, évaporée à sec et pesée. La phase aqueuse contenant les AG sous forme de sels de potassium est acidifiée avec un léger excès d'acide sulfurique (1 mol/L) par contrôle pH. Les AG libérés sont alors repris trois fois à l'hexane et la phase organique est ensuite lavée, séchée, évaporée à sec et pesée pour obtenir les AG. Les AG sont alors estérifiés avec du méthanol chlorhydrique à 2% (10:1, pds/v) au reflux pendant 30 min sous garde à  $\text{CaCl}_2$ . Après refroidissement, le mélange réactionnel est récupéré avec de l'eau et extrait trois fois à l'hexane. La phase hexanique est lavée à l'eau, séchée, filtrée, évaporée à sec et pesée pour donner les esters méthyliques (EM).

## II-4-1-2- Acides gras des phospholipides

Les AGPL sont directement libérés par transestérification de la fraction méthanol qui permet d'accéder directement aux AG sous leur forme estérifiée, c'est-à-dire, sous forme d'EM.

### Protocole de transestérification

L'extrait est porté à reflux 1h 30, sous garde à  $\text{CaCl}_2$  dans du méthanol chlorhydrique à 5% (10:1, pds/v). L'extraction des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) suit la même démarche que celle utilisée pour l'estérification : à savoir, reprise du mélange réactionnel à l'eau après refroidissement puis triple extraction à l'hexane, lavage à l'eau de la phase hexanique, séchage, évaporation à sec puis pesée finale des EM.

## II-4-2- Analyse des acides gras par CPG/SM

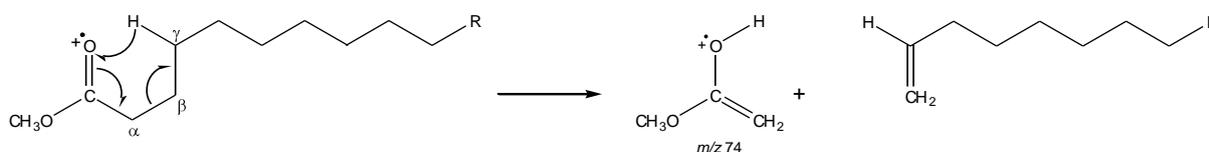
Les AG sont analysés par couplage chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse (CPG/SM). La CPG est une méthode chromatographique qui s'applique aux composés volatils ou susceptibles d'être vaporisés à température élevée sans qu'ils se décomposent.

La CPG permet la séparation des mélanges de produits de nature complexe et de volatilités différentes (Serpinet, 1995). Couplée à un spectromètre de masse, qui va jouer le rôle du détecteur, cet outil devient très puissant et permet à la fois de mettre en évidence le passage d'un composé dans l'effluent, d'en préciser la quantité relative par mesure de l'intensité du courant ionique observé et d'analyser les ions résultant de la fragmentation des ions radicaux  $\text{M}^{+\bullet}$ .

La phase stationnaire, liquide et visqueuse (silicones), est généralement contenue dans une colonne capillaire en silice fondue et peut être polaire ou apolaire. L'application d'un gaz vecteur correspondant à la phase mobile permet aux différents constituants du mélange de se détacher les uns des autres selon leur affinité pour la phase stationnaire. En sortie de colonne, les différents constituants sont fragmentés par impact électronique dans la chambre d'ionisation et détectés par le spectromètre de masse. Cette analyse peut être complétée par une ionisation chimique pour mieux visualiser les ions moléculaires, pas toujours visibles, voire absents, lors de la fragmentation produite par impact électronique, surtout avec l'énergie habituelle (70 eV), tout de même assez forte.

## II-4-3- Dérivés d'acides gras utilisés

Pour permettre une bonne analyse en couplage CPG/SM, les AG sont convertis en dérivés volatils. Nous avons travaillé avec deux principaux types de dérivés d'AG couramment utilisés par la communauté des lipidistes. Les premiers, les esters méthyliques d'AG (EMAG) sont les dérivés universellement utilisés pour l'analyse des AG en mélange. Ils sont obtenus directement par estérification (et/ou transestérification) comme cela a déjà été décrit précédemment. Ils ont l'avantage d'être facilement exploitables, peu polaires et très volatils. Deux ions clés caractéristiques des EMAG sont produits en CPG/SM à  $m/z$  74 et 87. Le premier correspond au pic de base résultant du réarrangement de Mac Lafferty (Figure 2-4), le second est attendu pour le fragment  $C_{3:0}$ .



**Figure 2-4 : Réarrangement de Mac Lafferty engendrant le pic de base  $m/z$  74**

Il y a captation d'un proton en  $\gamma$  de la fonction avec transfert d'électrons suivant un cycle à 6 centres, d'où la parité différente de celle des ions homologues voisins. L'analyse des EMAG permet la détermination du nombre de carbones constituant chaque AG par l'identification de l'ion moléculaire. Le nombre d'insaturations, la configuration normale, *iso* ou *anteiso* de la chaîne carbonée, ainsi que la présence d'autres fonctions comme les groupements hydroxyles, peuvent être observés par la présence d'ions fragments caractéristiques. Nous reviendrons sur ces fragments caractéristiques lors de l'étude des résultats obtenus.

Néanmoins, la faible stabilité de la tête polaire de ces dérivés sous impact électronique ne permet pas de déterminer les localisations des insaturations, parce que l'énergie conférée à l'ion  $M^{+\bullet}$  n'est pas concentrée sur ce pôle. Pour cela il faut utiliser des dérivés plus adéquats et l'approche alternative, permettant d'obtenir des informations sur la position des doubles liaisons, est de dériver la fonction carboxylique en introduisant un hétérocycle azoté (Christie, 1997).

Les *N*-acyl pyrrolidides (NAP) ont été les premiers dérivés d'AG contenant un hétérocycle azoté, des amides, utilisés pour apporter des informations sur les localisations des doubles liaisons mais aussi sur la présence de ramifications (groupements méthyles) (Andersson, 1978). Ces dérivés sont directement préparés à partir des EMAG et ont l'avantage de posséder un pôle fonctionnel suffisamment stable sous impact électronique. Cette stabilité minimise l'ionisation des doubles liaisons et leur migration le long de la chaîne aliphatique. A l'inverse des EMAG, les NAP se fragmentent par rupture radicalaire le long de la chaîne aliphatique et font ainsi apparaître des ions fragments homologues contenant la fonction et ce jusqu'à l'ion moléculaire lui-même. Les valeurs  $m/z$  des ions fragments présentent alors des intervalles réguliers de 14 sur le spectre de masse (la différence notée entre deux valeurs  $m/z$  d'ions fragments sera considérée comme sans unité dans la suite du mémoire), correspondant à la rupture de chaque liaison C-C et la perte d'un groupement méthylène ( $CH_2$ ). Il est alors possible de visualiser toute la chaîne carbonée, du début de l'extrémité fonctionnelle jusqu'à la terminaison de la chaîne. Des intervalles de 12 entre chaque ion proviennent de la fragmentation des doubles liaisons C=C et marquent ainsi la présence d'insaturations dans la chaîne aliphatique.

Le réarrangement de Mac Lafferty fait apparaître un pic de base à  $m/z$  113 (Figure 2-5). L'ion fragment  $m/z$  126 majeur est considéré comme le deuxième ion clé caractéristique des NAP.

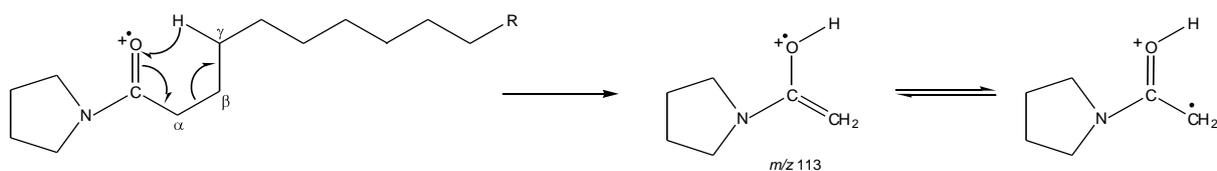


Figure 2-5 : Réarrangement de Mac Lafferty engendrant le pic de base  $m/z$  113

### Préparation des *N*-acyl pyrrolidides

Les NAP sont produits directement à partir des EMAG par réaction en présence d'acide acétique et de pyrrolidine (10:0,1:1, m/v/v) portés à reflux pendant une heure sous garde à  $\text{CaCl}_2$ . Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est repris à l'hexane et lavé avec une solution d'acide chlorhydrique dilué (1M) pour entraîner l'excès de pyrrolidine sous forme de chlorhydrate de pyridinium hydrosoluble puis lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralité, séché, évaporé à sec et pesé.

### Conditions d'analyses des acides gras

Les dérivés d'AG ont été analysés sur deux appareils CPG/SM équipés respectivement des colonnes capillaires apolaires de type DB-1 (30 m x 0,32 mm, épaisseur de phase 0,25  $\mu\text{m}$ ) et CP-Sil (60 m x 0,25 mm, 5 CB low bleed, épaisseur de phase 0,25  $\mu\text{m}$ ). La programmation de la température de la colonne capillaire (30 m) correspond à un palier isotherme à 170°C pendant 4 min puis 3°C/min de 170°C à 300°C pour les EMAG, un palier isotherme à 200°C pendant 4 min puis 3°C/min de 200°C à 310°C pour les NAP. Pour la CPG/SM équipée de la colonne capillaire de 60 m, la température de la colonne est programmée pour l'analyse des EMAG et des NAP de 30°C/min de 80°C à 170°C puis 3°C/min de 170°C à 295°C.

Dans les deux cas, le gaz vecteur utilisé est l'hélium, (split 1/50). La détection est réalisée par impact électronique à 70 eV.

## II-4-4- Méthodologie appliquée à l'analyse des acides gras

Pour chaque échantillon analysé en CPG/SM, les AG ont été identifiés sur la base de leur longueur de chaîne équivalente (LCE) et sur l'étude des spectres de masse de leur EM et/ou de leur NAP, l'utilisation conjointe de ces deux types de dérivés permettant d'avoir une certaine complémentarité au niveau des analyses des AG.

### II-4-4-1- Longueur de chaîne équivalente des acides gras en CPG/SM

La LCE permet d'apporter des confirmations sur les différentes familles d'AG identifiés : saturés, monoinsaturés, polyinsaturés, ramifiés, hydroxysubstitués, etc. En CPG, le temps de rétention de chaque dérivé d'AG dépend de son nombre de carbones. Il existe une linéarité entre le nombre de carbones et le temps de rétention pour une même famille d'AG. Par exemple, tous les dérivés d'AGS linéaires, ou tous ceux d'AGMI de la série n-6, vont présenter une linéarité lorsque leur temps de rétention sera exprimé en fonction du nombre de carbones. Cette relation linéaire se décrit par la droite  $t_R = a.N_C + b$  où  $t_R$  est le temps de rétention de l'AG (min) ;  $N_C$ , le nombre de carbones et  $b$  la pente de la droite. Le tracé de la droite des AGS permet de donner la longueur de chaîne équivalente d'un quelconque EMAG du mélange à partir de son temps de rétention.

Ainsi chaque AGS à chaîne normale présente une LCE égale précisément à son nombre de carbones et tous les dérivés d'AGS linéaires (EMAG, NAP) sont alignés entre eux. Il est alors possible, par lecture graphique, d'attribuer une valeur de LCE correspondante à chaque AG par rapport à la droite des

AGS à chaîne normale. Ainsi, par exemple l'acide 2-OH-18:0 va présenter une LCE de 19,13. Il en ressort plusieurs points importants.

Tout d'abord, les AG d'une même famille présentent une linéarité et les droites de chaque famille d'AG sont sensiblement parallèles entre elles. Par exemple, si nous prenons les AG hydroxylés en position 2 (2-OH-AG) (Figure 2-6), ils forment une droite parallèle à celle des AGS linéaires, ce qui confirme qu'il s'agit bien de la même série d'AG hydroxylés (Barnathan *et al.*, 1993). Mais ceci peut être également vérifié avec d'autres familles comme les AG ramifiés ou les AG monoinsaturés de la série n-9. Par contre, si l'un des AG est analysé comme appartenant à une famille particulière, par exemple les AGS à chaîne normale, et que son point est excentré de la droite des AGS, on peut faire l'hypothèse que cet AG n'appartient pas à la même famille, par exemple, il pourrait s'agir alors d'un AGS ramifié.

L'étude des LCE permet également d'observer différentes caractéristiques en fonction des familles d'AG et selon la phase stationnaire utilisée. Ainsi, en phase apolaire, les AGI précèdent toujours leurs analogues saturés, le temps de rétention diminuant avec l'augmentation du degré d'insaturation. Ceci ce traduit par une LCE plus faible que celle de leur correspondant saturé.

Les AG ramifiés vont présenter des temps de rétention caractéristiques, étant toujours élués avant leur isomère linéaire. Leur LCE sera fonction de la position de la ramification. Par exemple les AG ramifiés saturés 15:0 en *iso* et *anteiso* présenteront respectivement des LCE de 14,62-14,67 et 14,72-14,76. Les AG *iso* et *anteiso* présentent des droites parallèles distinctes l'une de l'autre.

Les 2-OH-AG ont la caractéristique d'être élués peu après l'AG saturé présentant un carbone supplémentaire, sur phase apolaire. Par exemple, le 2-OH-18:0 sera élué après le 19:0, le 2-OH-24:0 après le 25:0, etc., comme le montre la Figure 2-6.

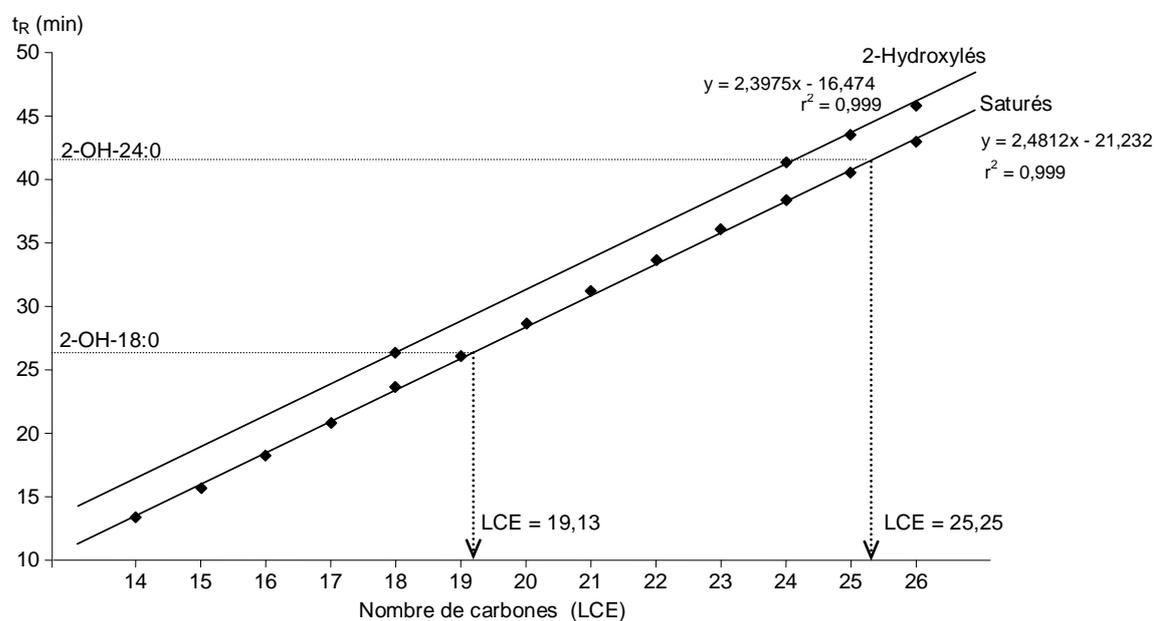


Figure 2-6 : LCE des acides gras saturés et 2-hydroxysubstitués chez *T. longibrachiatum* (EM, phase apolaire)

Comme nous le verrons plus loin, nous avons pu mettre en évidence la présence d'acides gras conjugués (AGC) dans les échantillons d'AG chez les souches testées. Nous y reviendrons plus en détails lorsque nous traiterons des AGC identifiés chez les quatre souches.

## II-4-4-2- Analyse des spectres de masse des grandes familles d'acides gras

### II-4-4-2-1- Acides gras saturés

Les AGS sont analysés très simplement sous la forme d'EMAG. Le spectre de masse obtenu sous impact électronique (70 eV) des esters saturés à chaîne normale est caractérisé par la présence de deux ions principaux à  $m/z$  74 (réarrangement de Mac Lafferty, pic de base) et  $m/z$  87 (qui correspond au fragment en  $C_3$ ). L'ion moléculaire  $M^+$  est également généré et accompagné d'ions fragments diagnostics  $[M-OCH_3]^+$  ( $M-31$ , perte du groupement méthoxy) ou  $[M-CH_3OH]^+$  ( $M-32$ , perte de méthanol) et  $[M-43]^+$  (perte d'un fragment  $C_3$ ). Différents fragments  $[CH_3COO(CH_2)_n]^+$  à intervalles réguliers de 14, traduisant la rupture C-C le long de la chaîne aliphatique sont également visibles chez les AGS, dont les plus abondants sont généralement, en plus de l'ion  $m/z$  87, les ions à  $m/z$  143 ( $C_{7:0}$ ) et 199 ( $C_{11:0}$ ). Le spectre de masse de l'EM de l'acide stéarique est illustré Figure 2-7.

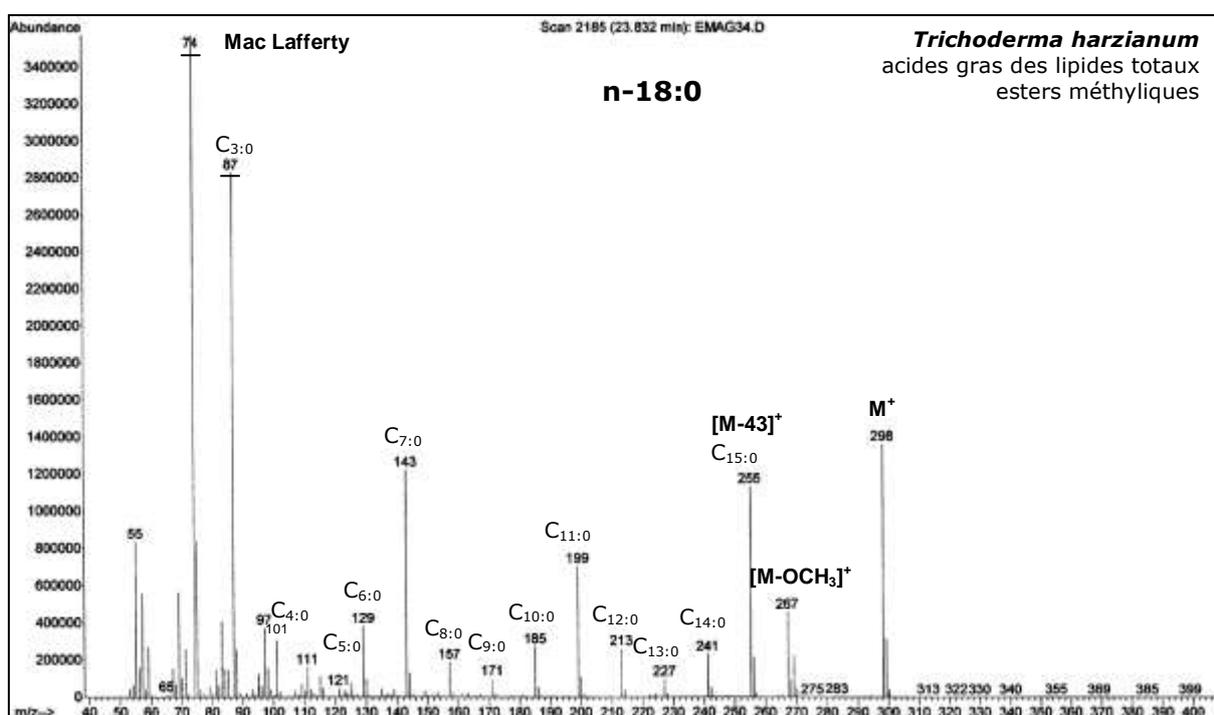
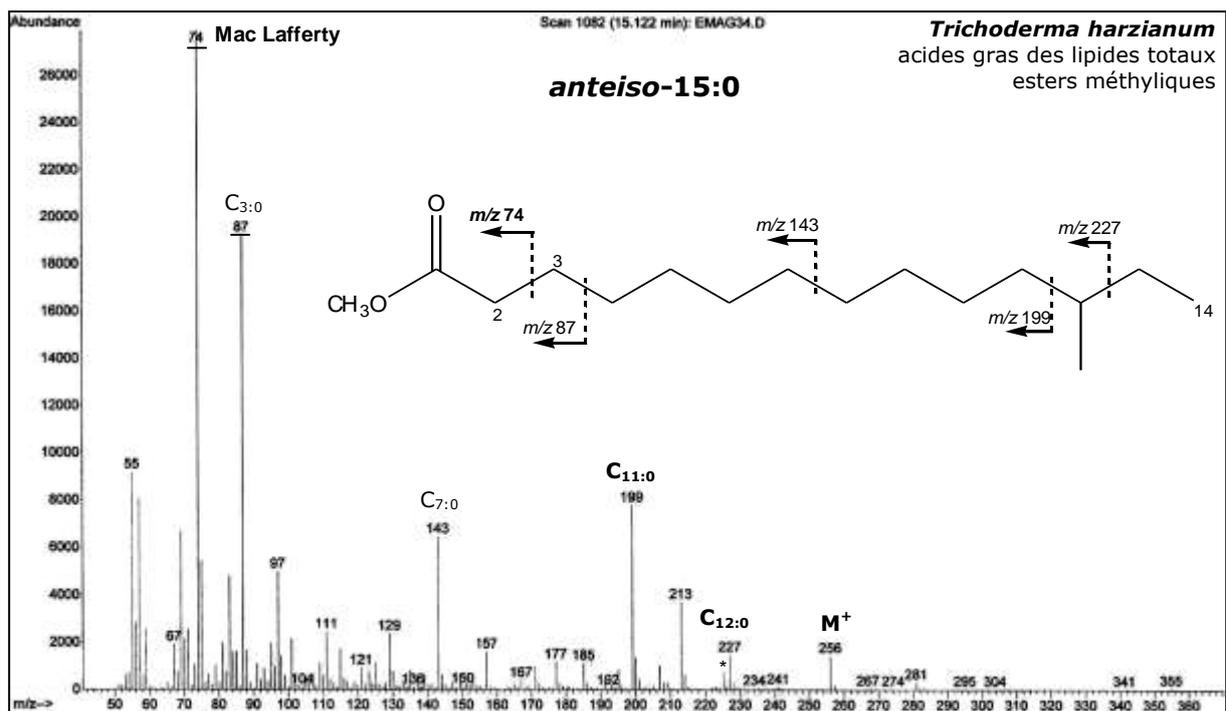
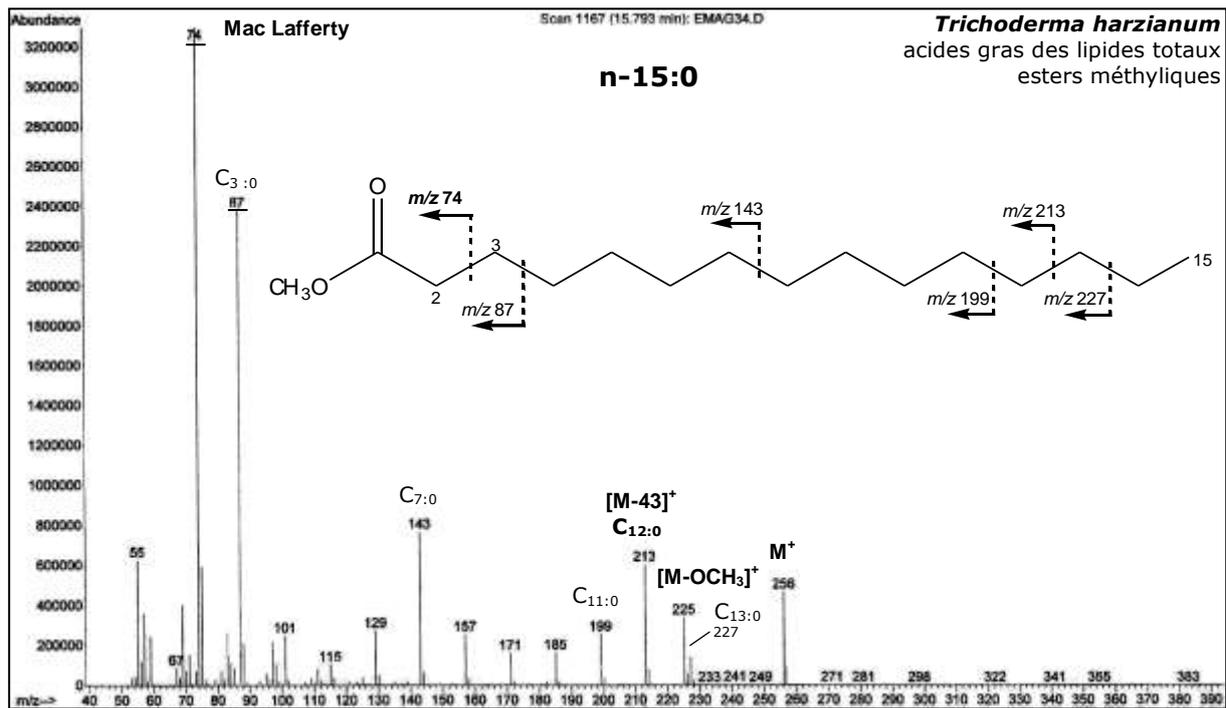


Figure 2-7 : Spectre de masse de l'EM de l'acide stéarique

Les ions  $m/z$  74 (Mac Lafferty, pic de base) et  $m/z$  87 sont majoritaires confirmant qu'il s'agit d'un AGS. L'ion moléculaire  $M^+$  ( $m/z$  298) apparaît nettement (30%), accompagné des ions fragments  $[M-31]^+$  ( $m/z$  267, perte du groupement méthoxy) et  $[M-43]^+$  ( $m/z$  255, perte d'un fragment  $C_3$ ). Plusieurs ions fragments  $[CH_3COO(CH_2)_n]^+$  sont observés à intervalles réguliers de 14, relatifs aux ruptures des liaisons C-C le long de la chaîne aliphatique :  $m/z$  101 ( $C_{4:0}$ ), 115 ( $C_{5:0}$ ), 129 ( $C_{6:0}$ ), 143 ( $C_{7:0}$ ), 157 ( $C_{8:0}$ ), 171 ( $C_{9:0}$ ), 185 ( $C_{10:0}$ ), 199 ( $C_{11:0}$ ), 213 ( $C_{12:0}$ ), 227 ( $C_{13:0}$ ), 241 ( $C_{14:0}$ ), 255 ( $C_{15:0}$  ou  $M-43$ ) et 269 ( $C_{16:0}$ ).

### II-4-4-2-2- Acides gras ramifiés

Les AG ramifiés peuvent être différenciés de leurs correspondants linéaires, en plus de la valeur de leur LCE, par l'analyse des spectres d'EM. En effet, la position de la ramification se traduit par l'abaissement du pic correspondant, au profit des pics voisins. A titre d'exemple, les spectres des EM des acides n-pentadécanoïque ( $n-15:0$ ) et *anteiso*-pentadécanoïque (*anteiso*-15:0) sont présentés Figure 2-8, page suivante.



\* [M-OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>

Figure 2-8 : Spectres des EM des acides n-pentadécanoïque et anteiso-pentadécanoïque

Au vu de ces spectres, il apparaît clairement des différences au niveau des derniers fragments entre les deux AG. Pour le n-15:0, le pic [M-43]<sup>+</sup> qui correspond au fragment C<sub>12</sub> (m/z 213) est plus abondant que les deux fragments qui l'entourent, correspondant aux fragments C<sub>11:0</sub> (m/z 199) et C<sub>13:0</sub> (m/z 227). Ce dernier est d'ailleurs très faible et dominé par le pic [M-31]<sup>+</sup> (m/z 225). Ce type de profil est caractéristique, comme nous l'avons déjà vu avec l'EM de l'acide stéarique, d'un AGS à chaîne normale. Chez l'anteiso-15:0, la ramification est positionnée en antépénultième position, soit, pour l'EM, au niveau du carbone 12 (m/z 213) qui correspond au pic [M-43]<sup>+</sup>. Il serait donc logique de rencontrer, contrairement au spectre de l'EM du n-15:0, le pic [M-43]<sup>+</sup> abaissé au profit de l'ion fragment en C<sub>13</sub> (m/z 227). C'est en partie

ce que l'on peut observer lorsque l'on analyse le spectre de l'EM de l'*anteiso*-15:0. En effet, le pic  $[M-43]^+$ , qui prédominait sur les ions  $m/z$  199 et 127 chez l'EM du n-15:0, est ici moins abondant et abaissé par rapport à l'ion fragment  $C_{11}$  ( $m/z$  199), prédominant. De plus, l'ion fragment  $C_{13}$  ( $m/z$  227) est plus important que le pic  $[M-31]^+$ , qui devient très faible. Ces caractéristiques confirment la présence d'une ramification en position 12 par rapport au n-15:0. Il est donc possible, à partir des EM, de localiser certaines ramifications. Toutefois, les dérivés NAP se montrent souvent plus adéquats pour la localisation des ramifications, avec des abaissments de pics assez nets des fragments ramifiés.

### II-4-4-2-3- Acides gras insaturés

Pour les AGI, les spectres de masse des esters vont différer de ceux des esters saturés d'autant plus que le nombre d'insaturations va augmenter. Pour les AGMI, le spectre de masse de l'EM présente généralement un pic moléculaire  $M^+$  plus faible que pour le correspondant saturé. L'ion moléculaire est accompagné des mêmes fragments  $[M-31]^+$  ou  $[M-32]^+$  et  $[M-43]^+$  qui certifient sa présence. Les fragments  $m/z$  74 et 87, caractéristiques des EM, sont présents mais à plus faible intensité que pour les AGS. Ils sont confondus dans une forêt de pics dont les principaux sont souvent ceux à  $m/z$  55, 69 et 83. Les ions fragments  $[CH_3COO(CH_2)_n]^+$  ne sont pas observés. Des fragments diagnostics, propres aux AGI, sont détectés tels que les pics correspondant à  $[M-74]^+$  et  $[M-116]^+$ . Le spectre de masse de l'EM de l'acide heptadécénoïque est illustré Figure 2-9.

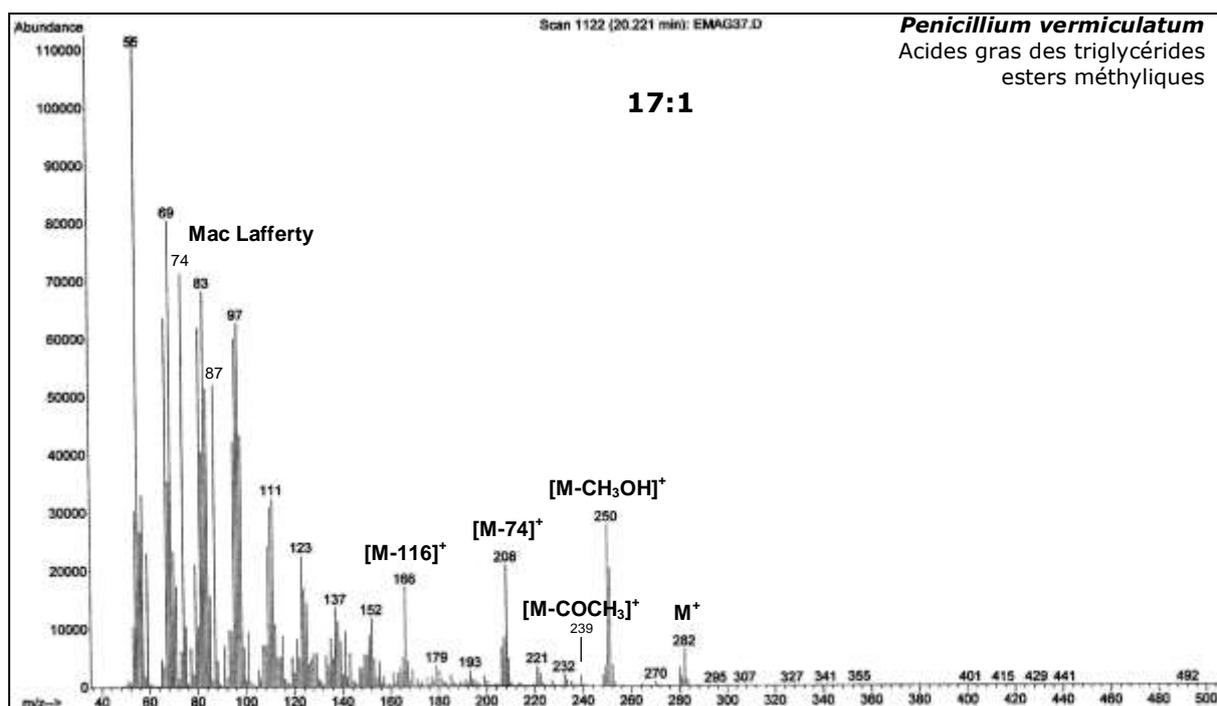


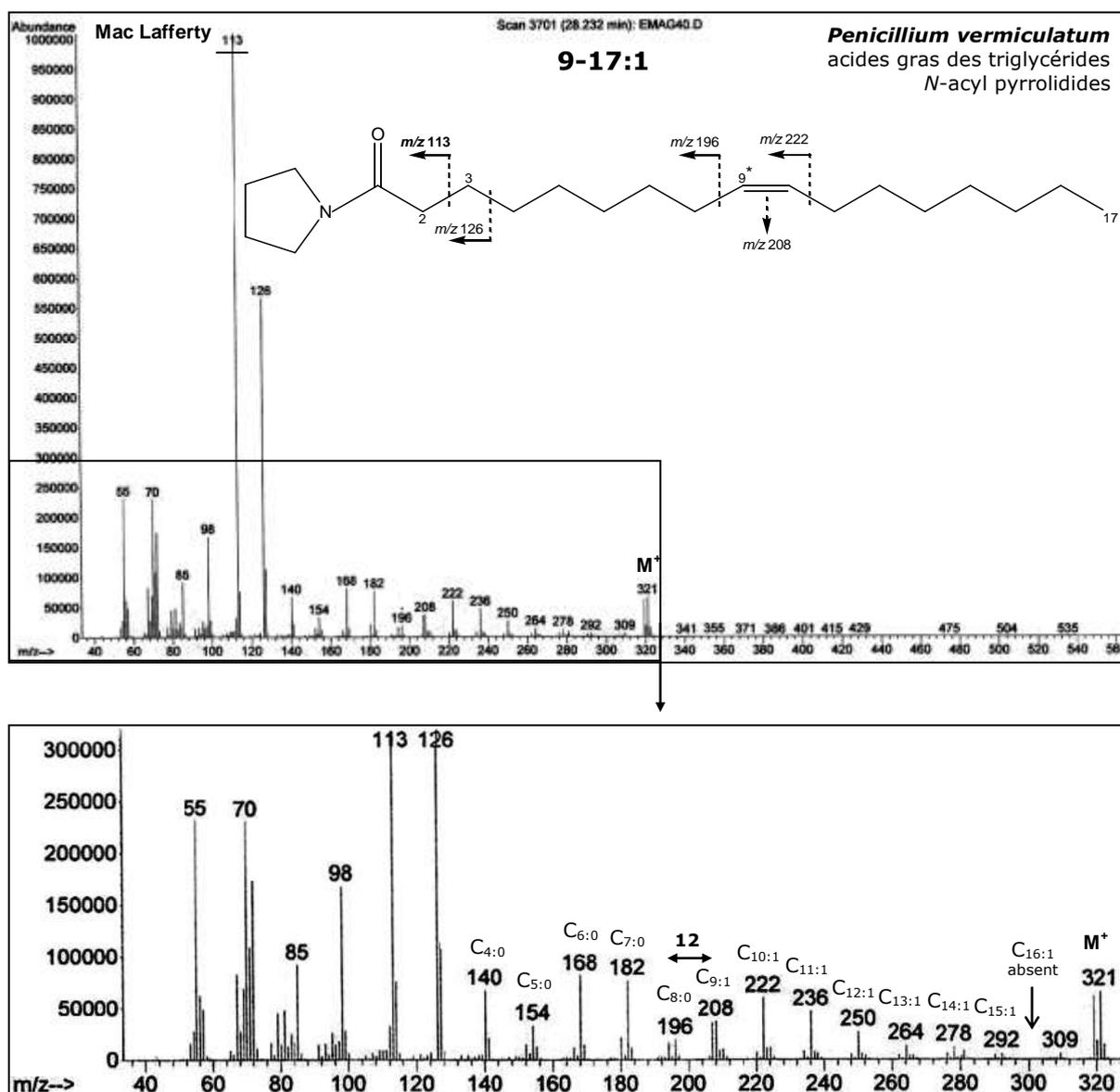
Figure 2-9 : Spectre de l'EM d'un acide heptadécénoïque

Les ions  $m/z$  74 et 87 sont bien observés sur ce spectre, confirmant qu'il s'agit bien d'un EMAG. Toutefois, ils ne correspondent pas aux pics principaux avec, respectivement, des abondances relatives d'au moins 60 et 45%. Il ne s'agit donc pas d'un ester saturé. L'ion moléculaire  $M^+$  ( $m/z$  282) qui correspond à un AG de 17 carbones présentant une insaturation apparaît assez faiblement. Néanmoins il est confirmé par la présence de plusieurs pics diagnostics tels que les pics  $[M-32]^+$  à  $m/z$  250 (26%) ;  $[M-43]^+$  à  $m/z$  239 (2%) ;  $[M-74]^+$  à  $m/z$  208 et  $[M-116]^+$  à  $m/z$  166.

L'analyse des spectres des EMAG ne permet pas de déterminer la position des doubles liaisons. En effet, les ions fragments  $[CH_3COO(CH_2)_n]^+$  qui correspondent aux ruptures des liaisons C-C le long de la

chaîne aliphatique ne sont pas identifiables. Ainsi, pour déterminer la position des insaturations, il est nécessaire d'utiliser des dérivés plus adéquats tels que les NAP d'acides gras.

En effet, comme nous l'avons déjà décrit, ces derniers vont produire, sous impact électronique, des pics à intervalles réguliers de 14 correspondant à la fragmentation de méthylène en méthylène tout le long de la chaîne aliphatique. La présence d'une insaturation va alors être caractérisée par un intervalle de 12 au lieu de 14. Le spectre de masse du NAP de l'acide 9-heptadécénoïque (9-17:1) est présenté Figure 2-10.



\* La configuration en *cis* de l'insaturation est hypothétique

Figure 2-10 : Spectre de masse du NAP de l'acide 9-heptadécénoïque

Le spectre de masse fait apparaître plusieurs ions fragments diagnostics permettant de conclure sur sa structure. Tout d'abord les ions  $m/z$  113 (réarrangement de Mac Lafferty, pic de base) et  $m/z$  126 ( $C_{3:0}$ ) confirment que nous sommes bien en présence d'un dérivé NAP d'acide gras. Il s'agit bien d'un AG monoinsaturé même si l'ion pseudomoléculaire  $m/z$  321 (17:1) est pollué par l'ion  $m/z$  319 (17:2). En effet, l'analyse des ions fragments résultant des ruptures radicalaires le long de la chaîne aliphatique permet de localiser l'insaturation au niveau du carbone 9. Les segments  $C_4$  à  $C_8$  et  $C_9$  à  $C_{15}$  sont bien saturés,

présentant des différences de 14. Par contre, en C-9, l'ion  $m/z$  210, normalement attendu si nous étions en présence du 17:0, est absent, remplacé par l'ion  $m/z$  208 ( $C_{9:1}$ ), ce qui équivaut à une différence de 12 au lieu de 14 entre les carbones 8 et 9. A partir du carbone 9 et ce jusqu'au carbone 15, le segment de chaîne est bien saturé. Chaque fragment montre alors une différence de 2 (-2H) avec les fragments normalement attendus pour l'AG correspondant (par exemple, 222 au lieu de 224, 236 au lieu de 238 etc.). L'ion  $m/z$  306 ( $C_{16:1}$ ) est absent, traduisant la linéarité de la fin de chaîne.

Nous venons de voir que les spectres d'esters monoinsaturés différaient de leur correspondant saturé, d'une part, au niveau des pics  $m/z$  74 et 87, plus faiblement générés et d'autre part, par l'absence des fragments de type  $[CH_3COO(CH_2)_n]^+$ . Les mêmes caractéristiques, plus accentuées, vont être observées chez les esters diinsaturés. Ainsi, les ions  $m/z$  74 et 87 sont très peu abondants, confondus dans une forêt de pics dont les principaux correspondent aux ions  $m/z$  55, 67, 81 et 95. L'ion moléculaire  $M^+$  est plus ou moins abondant, accompagné des pics diagnostics  $[M-31]^+$  ou  $[M-32]^+$ ,  $[M-43]^+$ ,  $[M-74]^+$  et  $[M-116]^+$ . A titre d'exemple est présenté le spectre de l'EM de l'acide linoléique (Figure 2-11).

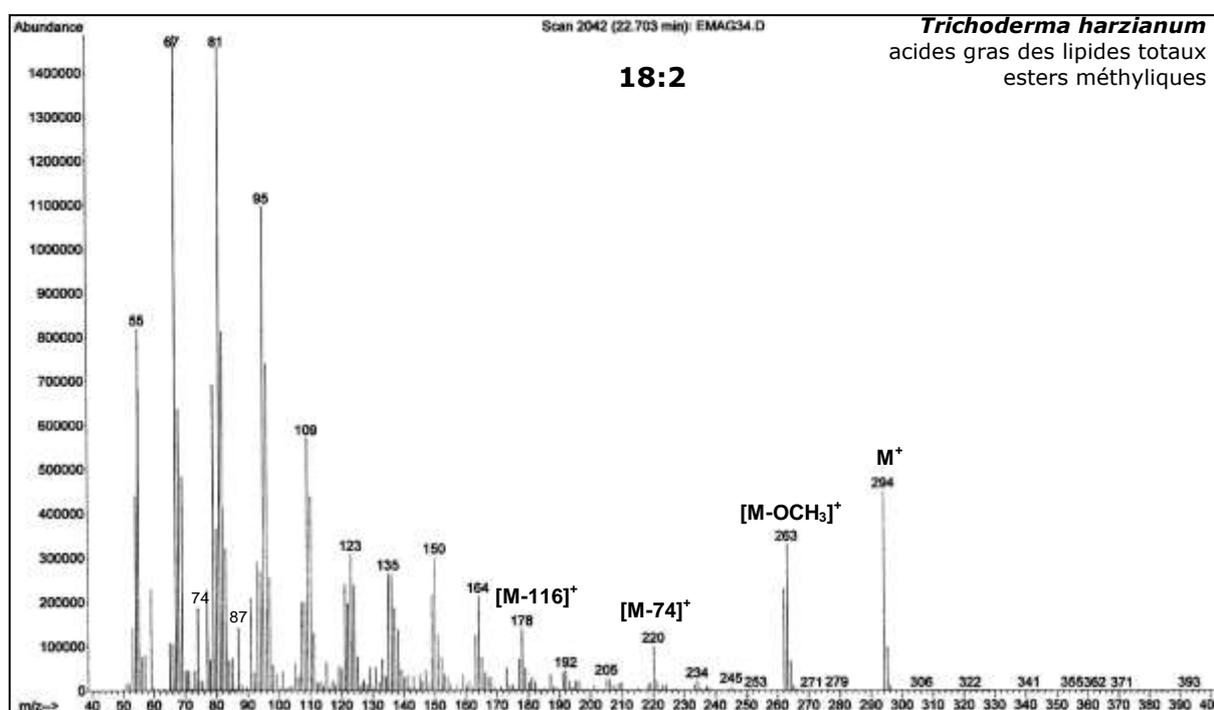


Figure 2-11 : Spectre de l'EM de l'acide linoléique

Les pics diagnostics  $m/z$  74 et 87 sont observés mais sont peu abondants. Comme nous l'avons dit, cet abaissement des pics caractéristiques des EM est d'autant plus important que les AG sont plus insaturés. Ils finissent même par être à peine visibles, voire absents, pour des AG présentant plus de quatre doubles liaisons. L'analyse de l'abondance de ces deux ions est d'ailleurs un élément clé dans l'analyse spectrométrique des EMAG lorsque l'ion moléculaire est faiblement abondant. On peut noter que les pics principaux correspondent aux ions  $m/z$  55, 67, 81 et 95. Nous verrons que l'abondance de ces ions principaux peut varier en fonction des AG. L'ion moléculaire  $M^+$  ( $m/z$  294) est significativement présent avec une abondance relative de 33%. Il s'agit bien d'un AG diinsaturé à 18 carbones. Les pics diagnostics  $[M-31]^+$ ,  $[M-43]^+$ ,  $[M-74]^+$  et  $[M-116]^+$  sont observés comme pour le spectre de l'EM du 17:1 (cf. Figure 2-9, page 62).

Pour déterminer les positions des doubles liaisons, il est indispensable, comme c'est le cas pour les AGMI de travailler avec les dérivés NAP. L'analyse des NAP des acides diinsaturés est réalisée de la même manière que celle des monoinsaturés en recherchant les intervalles de 12 traduisant l'existence et

donc la localisation des doubles liaisons. L'analyse du dérivé NAP de l'acide oléique est présentée comme illustration Figure 2-12.

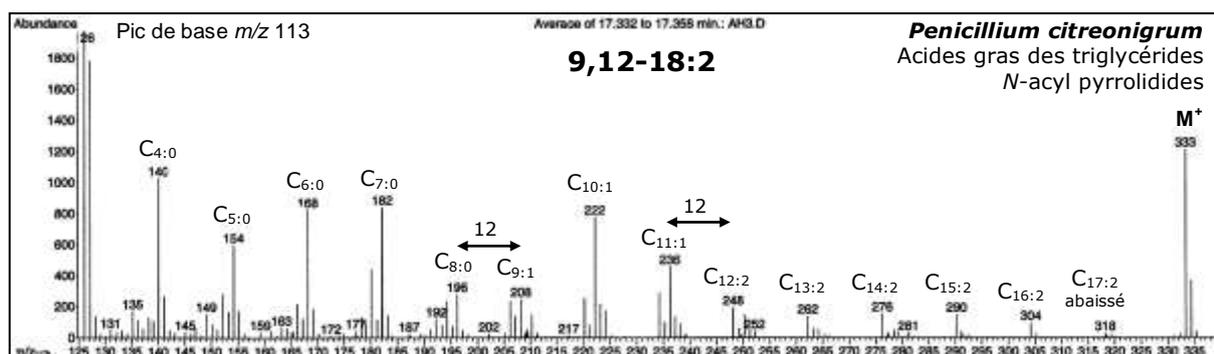
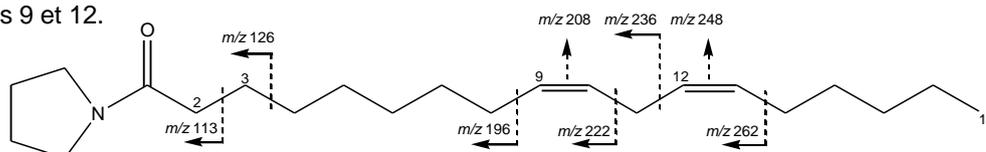


Figure 2-12 : Extrait d'un spectre de masse du NAP de l'acide linoléique

Comme c'était le cas pour les AGMI, le spectre de masse du NAP de l'acide 9,12-octadécadiénoïque fait apparaître plusieurs ions fragments diagnostics qui vont permettre de conclure sur la localisation des insaturations. Nous sommes ici en présence d'un extrait du pic  $m/z$  126 (l'ion  $m/z$  113, non visible ici, correspond au pic majoritaire). L'ion moléculaire  $M^+$  ( $m/z$  333) confirme qu'il s'agit d'un AG à 18 carbones présentant deux insaturations (337-4H). L'analyse des ions fragments résultant des ruptures radicalaires le long de la chaîne aliphatique permet de localiser les deux insaturations au niveau des carbones 9 et 12.



En effet, des différences de 14 sont observées entre les carbones 4 à 8 et 13 à 18 confirmant les parties saturées de la chaîne grasse. Par contre, comme c'était le cas pour le 9-17:1 (cf. Figure 2-10, page 63), en C-9, l'ion  $m/z$  210, normalement attendu est remplacé par l'ion  $m/z$  208 ( $C_{9:1}$ ). Une différence de 14 est ensuite observée entre les carbones 9 et 10 puis 10 et 11. Enfin, un intervalle de 12 réapparaît entre les carbones 11 et 12 au lieu de 14 avec l'ion  $m/z$  248 observé ( $C_{12:2}$ ). A partir du carbone C-12, on revient sur le segment de chaîne saturé. Le fragment  $C_{17}$  ( $m/z$  318) est abaissé, ce qui permet de conclure que la fin de chaîne est linéaire.

#### II-4-4-2-4- Acides gras 2-hydroxylés

Les 2-OH-AG sont facilement détectables dans un mélange complexe d'EMAG, d'une part par l'observation d'ions fragments diagnostics au niveau de leur spectre de masse (Barnathan *et al.*, 1993) et d'autre part, par leur caractéristique d'éluion. En phase apolaire, ces AG ont pour caractéristique d'être élués peu après l'ester méthylique de l'AG saturé comportant un carbone supplémentaire. Les 2-hydroxysubstitutions sont indiquées, pour les EMAG, par la présence des ions diagnostics  $m/z$  90, provenant du réarrangement de Mac Lafferty, et  $m/z$  103, au lieu des ions clés usuels  $m/z$  74 et 87 respectivement. L'ion moléculaire  $M^+$  est nettement observé, accompagné des ions fragments  $[M-31]^+$  ou  $[M-32]^+$  et  $[M-COOCH_3]^+$  soit (M-59). Ce dernier, caractéristique des 2-OH-AG, est significativement présent. Le spectre de masse de l'EM de l'acide stéarique 2-hydroxylé (2-OH-18:0) est présenté Figure 2-13, page suivante.

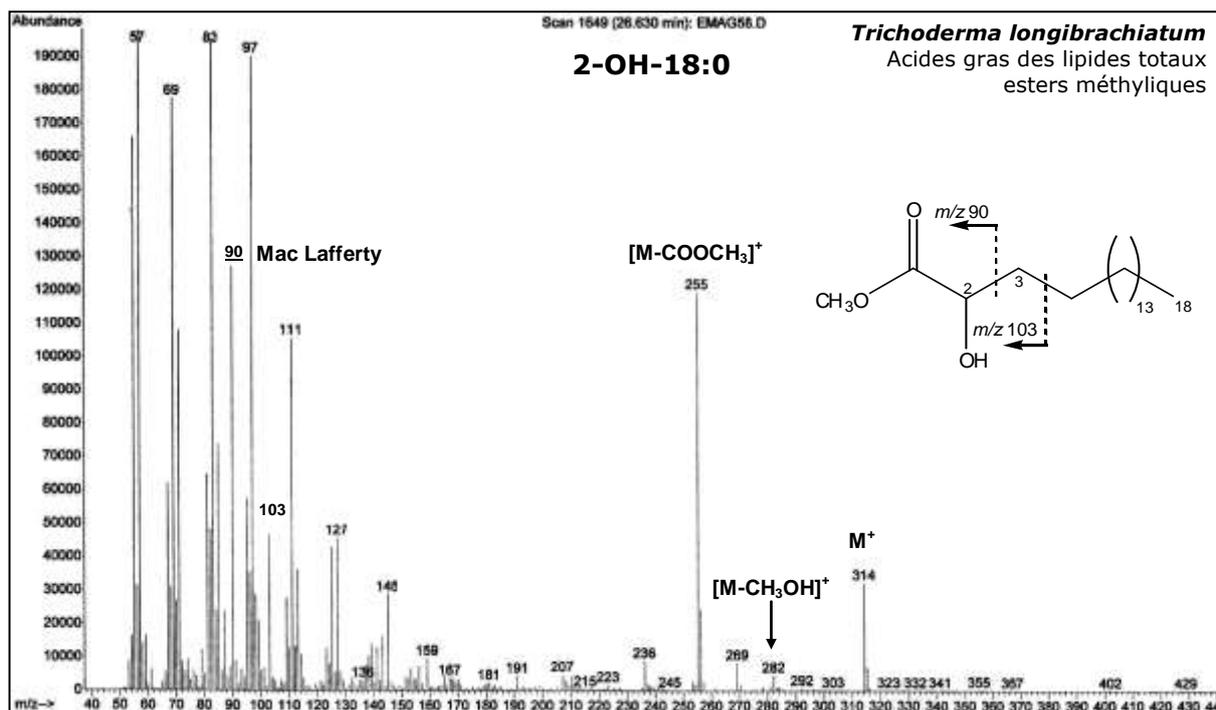


Figure 2-13 : Spectre de l'EM de l'acide 2-hydroxyoctadécanoïque

L'hydroxysubstitution en position 2 est confirmée par la présence des ions diagnostics  $m/z$  90 et  $m/z$  103. L'ion moléculaire  $M^+$  ( $m/z$  314) apparaît nettement (20%), accompagné des ions fragments  $[M-32]^+$  à  $m/z$  282 et  $[M-59]^+$  à  $m/z$  255, abondant (60%) caractéristique d'une hydroxylation en position 2. Il s'agit bien d'un AGS à 18 carbones et hydroxylé ( $298+16 = 314$ ).

## II-4-4-3- Mise en évidence de la présence d'acides gras conjugués

### II-4-4-3-1- Comparaison des profils chromatographiques

L'étude des AG en CPG/SM a été exclusivement réalisée en phase stationnaire apolaire. En phase silicone apolaire, comme nous l'avons déjà mentionné auparavant, les AGI ont la caractéristique d'être élués avant leur correspondant saturé et leur temps de rétention diminue avec l'augmentation du degré d'insaturation.

Au cours de l'analyse des différents échantillons des quatre souches étudiées, nous avons pu remarquer que certains EMAG/NAP insaturés étaient élués à des temps anormaux compte tenu de leur nombre de carbones, c'est-à-dire de leur masse moléculaire. En effet, certains AG présentaient souvent des temps de rétention supérieurs à leur correspondant saturé en phase apolaire. Ceci a pu être mis en évidence pour des AG diinsaturés à 16, 17, 18 et 19 carbones et triinsaturés à 18 carbones.

Nous avons alors émis l'hypothèse que la présence de liaisons conjuguées pouvait être responsable de cette caractéristique d'élué. En effet, la conjugaison des doubles liaisons entraîne, par effet électronique, une rétention des AG par la phase stationnaire nettement plus forte que pour un isomère non conjugué et même que, pour l'AGS correspondant.

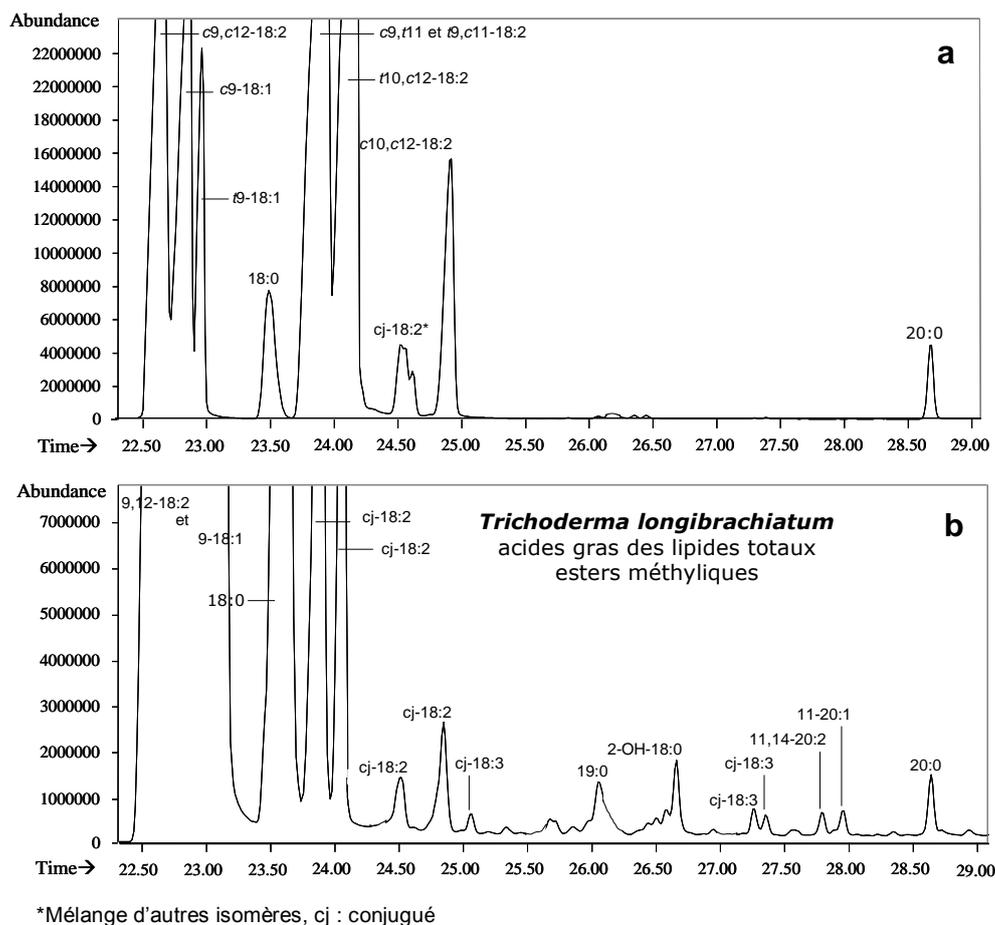
Afin de confirmer cette hypothèse, c'est-à-dire que les AGI présentant des temps de rétention anormaux sur ce type de phase correspondent bien à des AGC, nous avons analysé, dans les mêmes

conditions expérimentales, des EMAG standards commerciaux (Sigma). Deux échantillons d'AG ont été analysés séparément puis ensemble en CPG/SM:

- Un mélange d'EMAG usuels saturés et insaturés allant de 14 à 22 carbones avec notamment l'acide linoléique (9,12-18:2), l'acide oléique (9-18:1) et l'acide stéarique.
- Un mélange d'AGC, constitué d'isomères conjugués 9,11-18:2 et 10,12-18:2 de l'acide linoléique (ALC)

Les injections des deux mélanges séparément ont montré que les différents isomères d'ALC présentaient des temps de rétention supérieurs à ceux des acides linoléique et stéarique. Ces observations ont été confirmées lorsque les deux mélanges ont été analysés ensemble. Les isomères d'ALC sortaient bien après l'EM de l'acide stéarique, présentant des LCE allant de 18,11 à 18,50 au lieu de 17,66 pour l'acide linoléique 9,12-18:2. Cette analyse a permis de confirmer qu'en phase stationnaire apolaire, les AGC sont retenus plus longtemps que leurs isomères correspondants non conjugués. Ainsi, toute rétention anormale pourra traduire la présence de systèmes conjugués au niveau des doubles liaisons.

Pour chaque échantillon d'EMAG, nous avons comparé les temps de rétention des AG avec ceux des échantillons commerciaux. La comparaison du chromatogramme partiel d'un échantillon des EMAG des lipides totaux de *T. longibrachiatum* avec le mélange commercial est présentée Figure 2-14.



**Figure 2-14 : Comparaison des chromatogrammes partiels de mélanges d'EM usuels et conjugués standards (Sigma, a) et d'EM d'origine fongique (lipides totaux de *T. longibrachiatum*, b)**

Une correspondance des temps de rétention peut être notée entre certains AG des échantillons commercial (a) et naturel (b). C'est le cas pour l'acide stéarique avec respectivement 23,50 et 23,55 min mais aussi pour les ALC. En effet, les isomères d'ALC commerciaux c9,t11/t9,c11 et t10,c12, présentent

des temps de rétention proches de ceux des deux premiers acides octadécadiénoïques conjugués cj-18:2, élués juste après l'EM de l'acide stéarique chez *T. longibrachiatum*, et présentant des LCE de 18,11 (23,88 min) et 18,20 (24,04 min) respectivement.

Ci-dessous figurent les temps de rétention et les LCE correspondant aux quatre principaux ALC standards analysés en CPG/SM sur colonnes capillaires de 30 et 60 m (Tableau 2-3).

**Tableau 2-3 : Caractéristiques d'élution des ALC standards**

ALC commerciaux	$t_R$ (min) <sup>1</sup>		LCE
	30 m	60 m	
c9,t11-18:2 et t9,c11-18:2	12,44	23,90	18,11
t10,c12-18:2	12,65	24,09	18,18
cj-18:2 <sup>2</sup>	13,13	24,54	18,40
c10,c12-18:2	13,51	24,84	18,54

<sup>1</sup> Temps de rétention sur colonne capillaire apolaire de 30 m et de 60 m

<sup>2</sup> Mélange de plusieurs isomères d'ALC (dont le t9,t11-18:2, données Sigma)

L'utilisation d'une phase stationnaire apolaire, pour l'analyse des AG en CPG/SM, permet ainsi de détecter facilement la présence d'AGC dans des échantillons naturels d'AG en se focalisant sur leur particularité d'élution. Nous avons procédé ainsi pour tous les autres échantillons d'AG, en étudiant à la fois les spectres de masse des EMAG et en comparant leur comportement chromatographique avec les EMAG standards, du moins en ce qui concerne les AG à 18 carbones.

N'ayant pas à notre disposition de mélanges de référence d'EM d'ALnC, une telle comparaison chromatographique ne peut être réalisée que pour les AG octadécadiénoïques conjugués.

#### II-4-4-3-2- Analyse des spectres de masse des acides gras conjugués diinsaturés

Concernant les ALC, nous avons mentionné précédemment que certains pics CPG des échantillons naturels présentaient des temps de rétention très proches de ceux des mélanges commerciaux, notamment pour les deux ALC majoritaires élués juste après l'EM de l'acide stéarique (LCE = 18,11 et 18,18).

Si nous prenons le cas des AG des lipides totaux de *T. longibrachiatum*, les spectres de masse des EM des deux AGC majoritaires, correspondant aux pics CPG à 23,88 et 24,06 min (cf. Figure 2-14, page précédente), sont très similaires à ceux des AGC commerciaux (Figure 2-15 et Figure 2-16, pages suivantes).

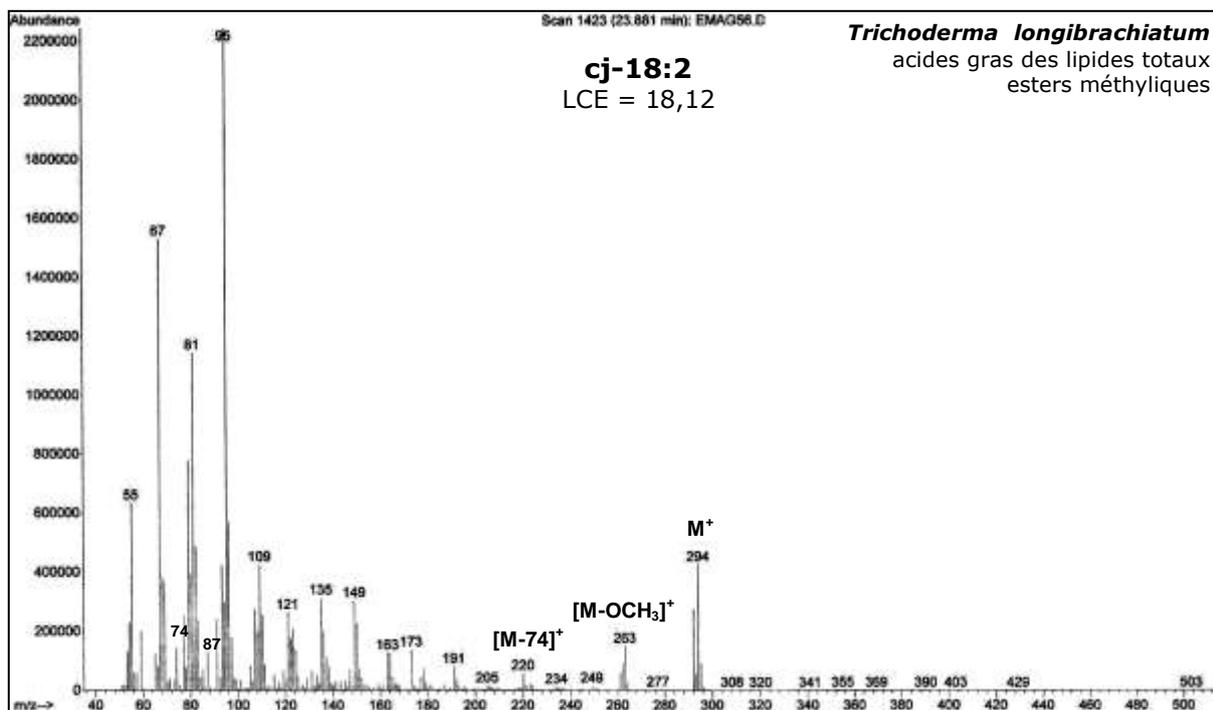
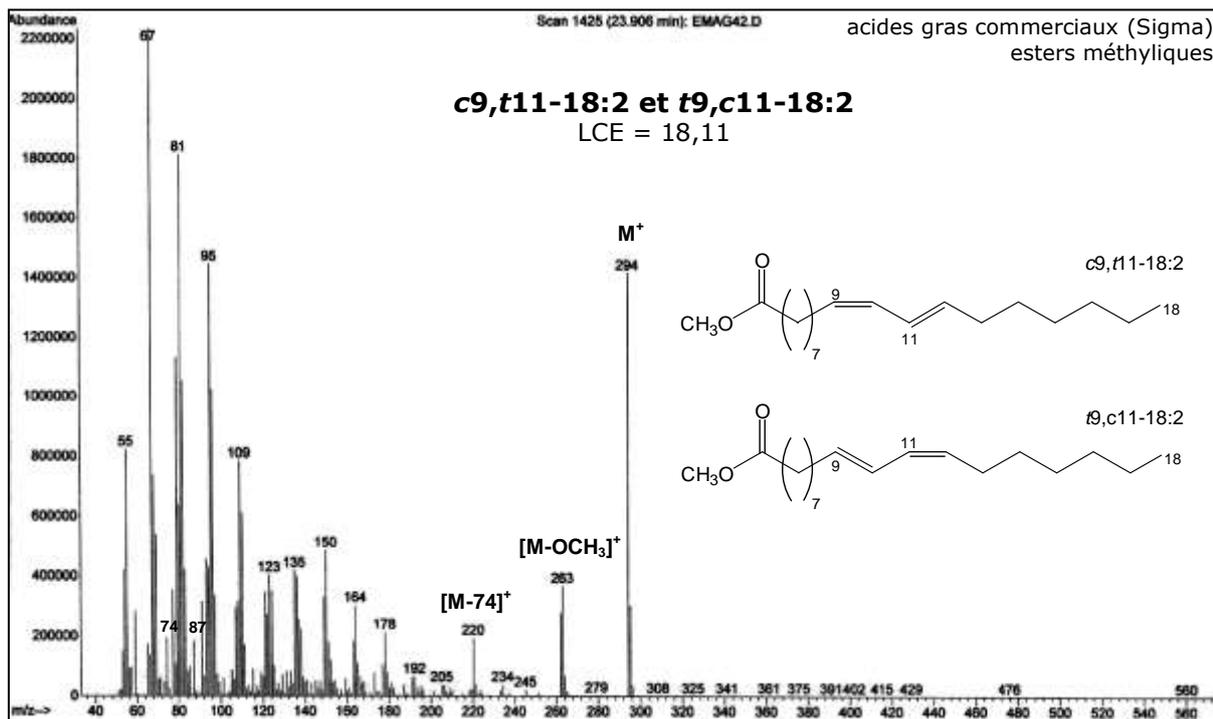


Figure 2-15 : Comparaison des spectres des EM des acides c9,t11/t9,c11-18:2 commerciaux et de l'acide conjugué présentant une LCE de 18,12

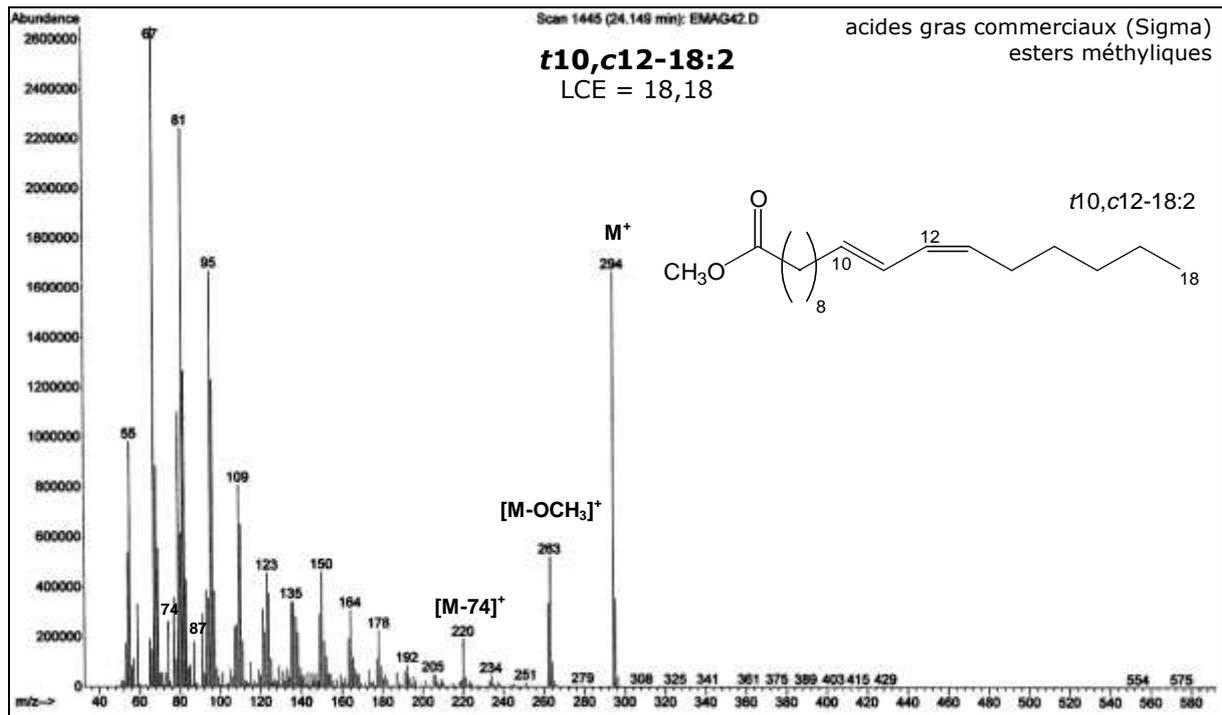
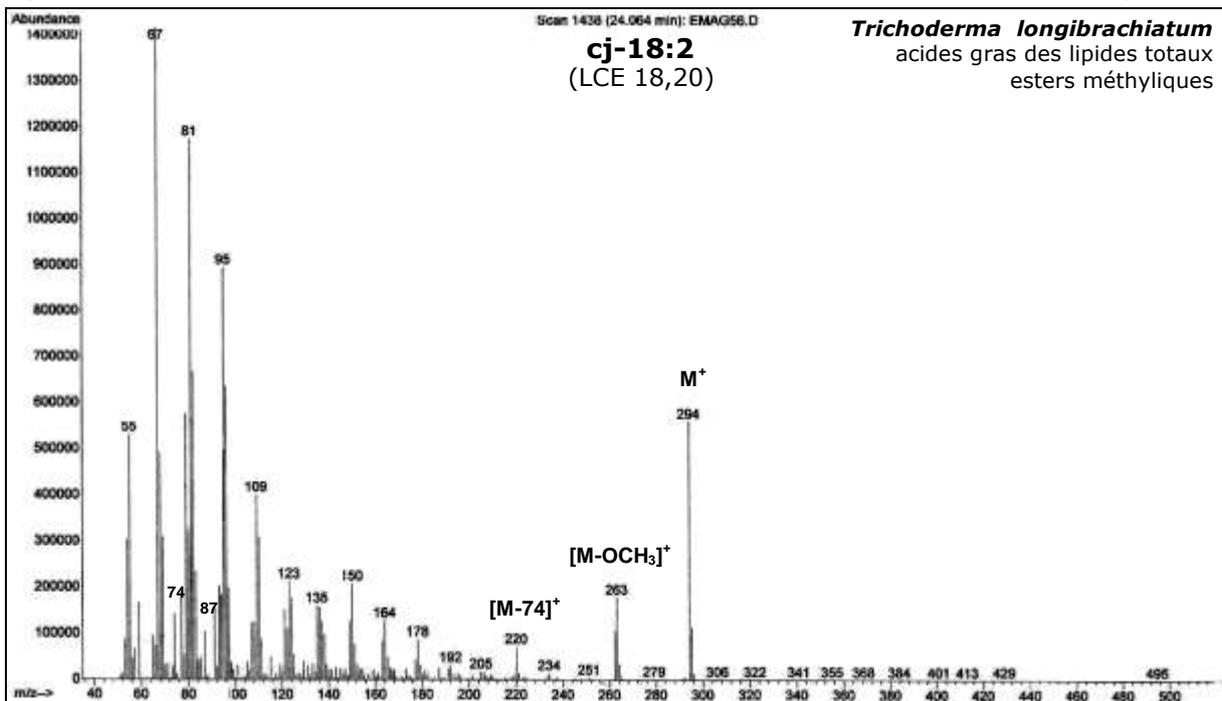


Figure 2-16 :

Comparaison



des spectres des EM de l'acide t10,c12-18:2 commercial et de l'acide conjugué présentant une LCE de 18,20

En effet, les ions fragments majoritaires à  $m/z$  67, 81 et 95 (80-100% d'intensité relative) sont observés pour les deux AGC (LCE = 18,11 et 18,18). Pour chaque spectre de masse, les ions caractéristiques à  $m/z$  74 (Mac Lafferty) et 87 présentent des intensités relatives faibles, alors que l'ion moléculaire M<sup>+</sup> à  $m/z$  294 est spécialement abondant (pouvant atteindre 60% d'intensité relative).

Ces observations sont en adéquation avec les spectres de masse d'AGC présentés dans la Web Lipid Library ([www.lipidlibrary.co.uk](http://www.lipidlibrary.co.uk)). L'ion clé caractéristique à  $m/z$  263, correspondant au fragment  $[M-OCH_3]^+$  soit M-31, est de la même manière, facilement observable dans tous les cas avec des abondances relatives pouvant atteindre 14%.

Les spectres de masse des NAP ne nous permettent pas de localiser complètement la position des conjugaisons pour les ALC, comme le montre le spectre de masse, Figure 2-17, pour *P. vermiculatum* (TG).

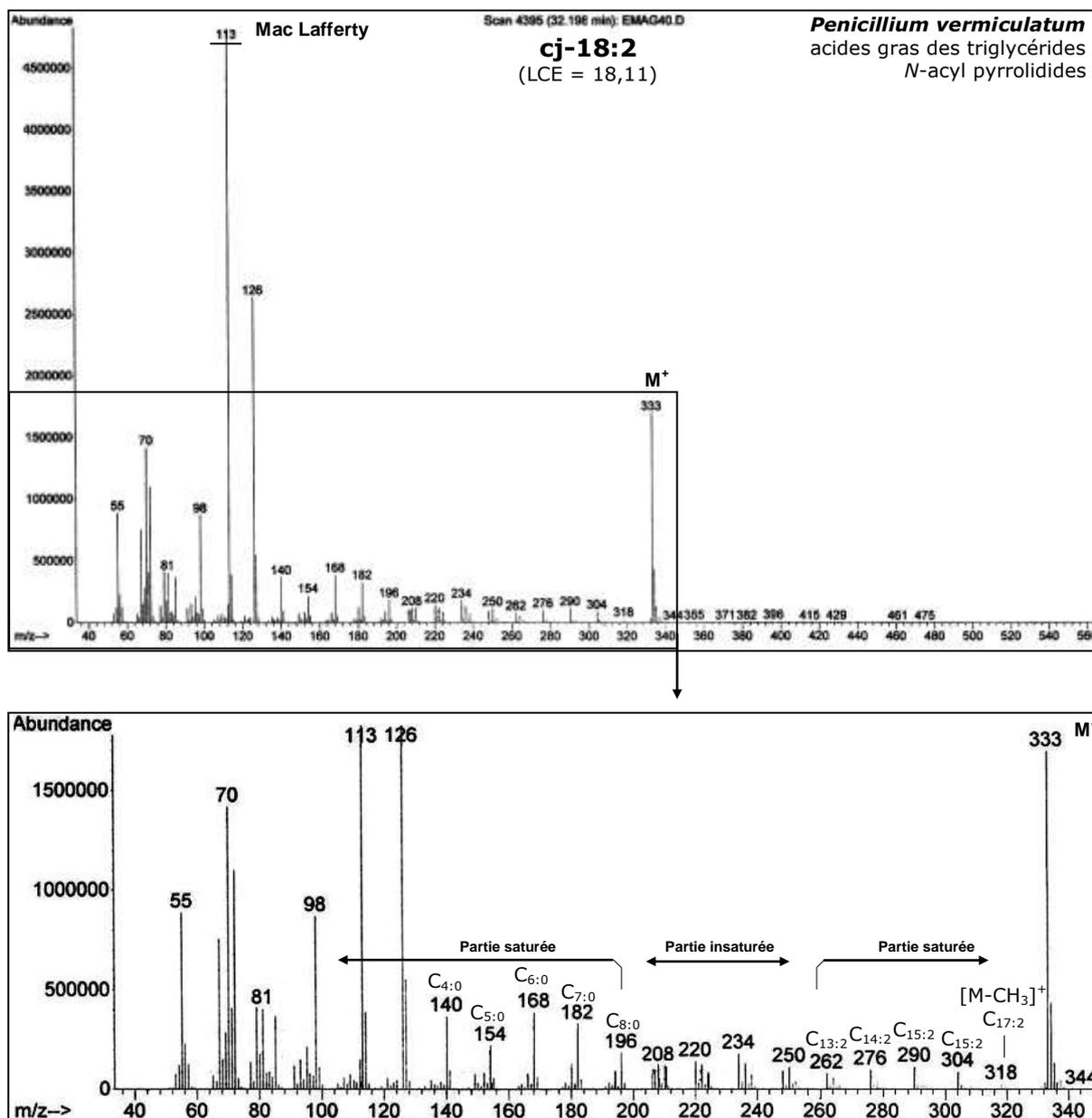


Figure 2-17 : Spectre de masse du dérivé NAP du premier ALC (LCE = 18,11) élué après l'acide stéarique (*P. vermiculatum*, AG des triglycérides)

Néanmoins, les séquences usuelles, incluant des ions  $m/z$  113 (Mac Lafferty), 126, 140, 154, 168, 182 et 196, présentant des intensités significatives sont observables traduisant que :

- les isomères 6,8-18:2 ou 7,9-18:2 ne sont pas présents dans le mélange d'AG
- la chaîne est saturée jusqu'au carbone 8

De plus, des différences de 14 sont aussi observées à partir du fragment  $m/z$  262 et ce, jusqu'au fragment caractéristique  $m/z$  318  $[M-CH_3]^+$ , confirmant que la chaîne est bien saturée entre les carbones 13 et 18. L'étude des NAP nous permet alors de suggérer que les doubles liaisons conjuguées sont localisées entre les carbones 9 et 12, c'est-à-dire que deux systèmes conjugués sont possibles  $\Delta 9,11$  et  $\Delta 10,12$ . Nous procédons de la même manière pour les quatre souches, en comparant les LCE des EM des ALC majoritaires à ceux des témoins commerciaux et en s'appuyant sur les spectres de masse des NAP correspondants.

#### II-4-4-3-3- Analyse des spectres de masse des acides gras conjugués triinsaturés

Comme c'était le cas chez les ALC, les spectres d'EM des ALnC présentent les ions fragments usuels  $m/z$  74 (Mac Lafferty) et 87 très peu abondants, alors que les ions moléculaires  $m/z$  292 (18:3) sont très abondants, pouvant atteindre 70% comme le montre la Figure 2-18.

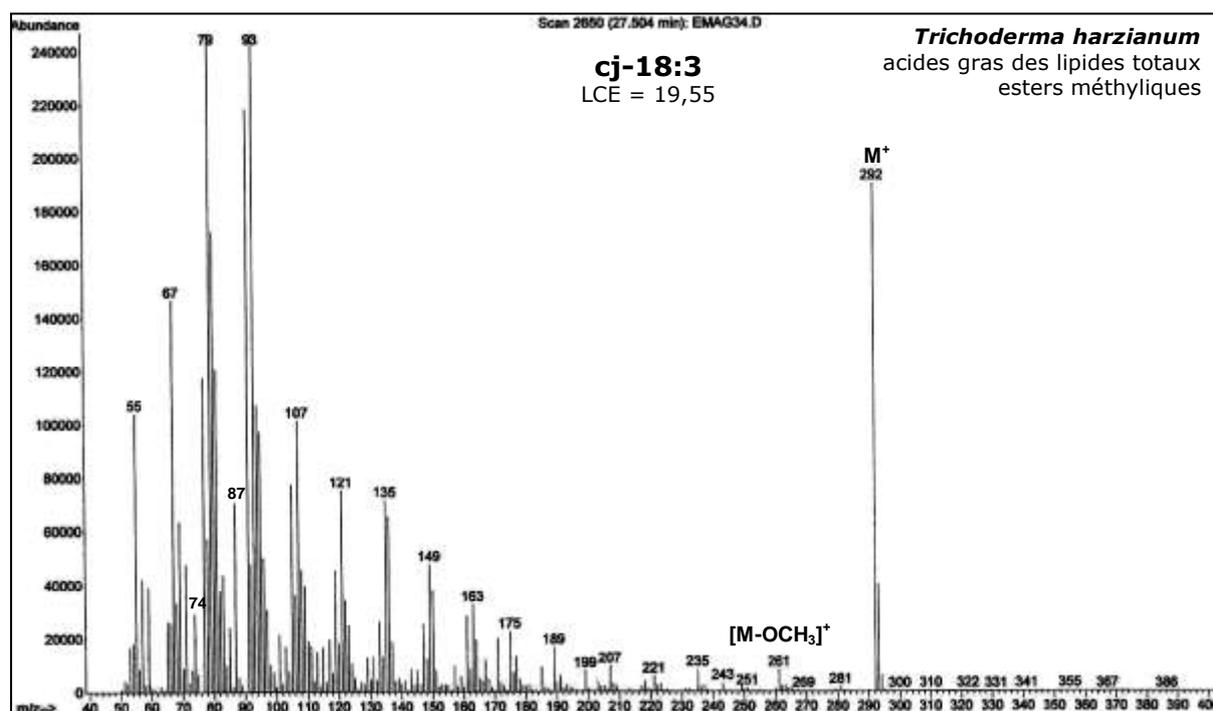


Figure 2-18 : Spectre de masse CPG/SM de l'EM d'un acide linoléique conjugué

Il s'agit du spectre de masse du dernier isomère d'ALnC (LCE = 19,55) identifié dans les échantillons d'AG des lipides totaux de *T. harzianum*. Nous avons pu remarquer, en comparant les spectres de masse des différents isomères détectés, que plus les ALnC étaient élués tardivement, plus leur ion moléculaire était abondant. De manière similaire aux ALC, l'ion fragment diagnostique  $[M-31]^+$  à  $m/z$  261 est observé en moyenne à 10% et confirme donc bien l'ion pseudomoléculaire  $m/z$  292.

L'utilisation des dérivés NAP ne nous permet pas de déterminer la localisation des doubles liaisons. Néanmoins, des fragments de chaînes saturés, dans certains cas, ont pu être observés depuis les carbones 2 à 7 et 15 à 18 respectivement, suggérant ainsi la présence possible des isomères 9,11,13-18:3 et 8,10,12-18:3 pouvant présenter chacun d'eux de nombreuses possibilités d'isomères de configuration (*c,c,c*; *t,t,t*; *c,t,c*; etc.).

## II-4-5- Concentration des acides gras par complexation avec l'urée

Bien que non considérée comme une technique de séparation, la complexation avec l'urée a été longtemps utilisée en laboratoire pour la purification de l'acide oléique et linoléique et l'enrichissement de fractions contenant des AG ramifiés (Sonntag, 1979). Cette technique, découverte par Bengen en 1940 est reconnue en chimie des lipides pour enrichir les huiles en AGPI (Iverson et Weik, 1967).

Le principe de cette méthode repose sur la propriété de l'urée à cristalliser sous la forme d'un réseau tridimensionnel. En présence d'un solvant organique polaire (éthanol, méthanol) l'urée forme une structure compacte tétragonale stable présentant des canaux de 5,67 Å de diamètre (Smith, 1952). En présence d'AG, elle va former des cristaux hexagonaux présentant des canaux de 8 à 12 Å de diamètre interne dans lesquels seront piégés principalement, de par leur conformation linéaire, les AGS et dans une moindre mesure les AGMI. Seront exclus du réseau tous les AGPI et les AG ramifiés qui présentent des courbures et des encombrements réduisant la formation et la stabilité du complexe avec l'urée. Cette technique repose ainsi sur le phénomène d'inclusion – non inclusion des AG dans le réseau cristallin de l'urée.

La complexation avec l'urée a été utilisée pour enrichir des fractions contenant les AGPI comme par exemple l'ARA produit par le champignon *Mortierella alpina* (Zhu *et al.*, 2002) ou des « oméga-3 » contenus dans les huiles de poissons (Hidajat *et al.*, 1995). Ce procédé de concentration est d'ailleurs également utilisé à grande échelle et mis en œuvre en tant que prétraitement des huiles riches en AGPI.

### Mode opératoire

Dans un ballon sont mis en présence, AG, urée et méthanol (1:2:0,01, pds/pds/v). Le tout est porté à reflux jusqu'à solubilisation complète de l'urée. Après retour à température ambiante, le mélange est cristallisé à 4°C pendant 1 h. Deux phases apparaissent, la fraction non complexée à l'urée (ou fraction non incluse) contenant les AGI, fluide limpide, et la fraction complexée à l'urée (ou fraction incluse), cristallisée, piégeant principalement les AGS. Après séparation par filtration, de l'eau distillée est ajoutée à chacune des fractions puis les acides gras sont extraits à l'hexane (1:1, v/v). Chaque fraction est ensuite évaporée, séchée puis pesée. Les inclusions répétées à l'urée peuvent être réalisées sur chaque fraction incluse et non incluse obtenues pour les enrichir de plus en plus respectivement en AGS et en AGI.

## II-4-6- Chromatographie liquide haute performance

L'intérêt de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) réside en son haut pouvoir résolutif conféré par la faible granulométrie de la phase stationnaire solide. Cette chromatographie permet de séparer les constituants d'un mélange qui vont être élués à des vitesses plus ou moins importantes selon l'effet de rétention exercé par la phase stationnaire, contenue dans la colonne chromatographique, et l'effet d'entraînement provoqué par la phase mobile liquide (Rosset *et al.*, 1982).

La très faible granulométrie de la phase stationnaire nécessite des pressions élevées pour la phase mobile. Ces fortes pressions vont être fournies par la pompe de la CLHP et permettront d'accélérer la migration des différents constituants en diminuant le temps nécessaire aux produits pour parcourir la chaîne CLHP depuis l'injecteur jusqu'au flacon récepteur.

Deux types de phases stationnaires sont utilisés en CLHP nommées normale et inverse. Les phases normales sont, la plupart du temps, constituées d'un gel de silice non modifiée. Il existe des phases normales pour lesquelles des groupements organiques polaires peuvent être greffés sur la silice. C'est le cas des colonnes Diol où la silice est greffée par des groupements glycéropopyles. La séparation s'effectue par polarité croissante avec des phases mobiles peu polaires. Les phases inverses correspondent à des gels de silice modifiée par des groupements organiques apolaires. La phase inverse la plus connue correspond un gel de silice greffée par des groupements hydrocarbonés à 18 carbones (chaîne octadécyl  $C_{18}$ ). La séparation s'effectue ici par polarité décroissante avec des phases mobiles polaires.

Les AG peuvent être séparés par CLHP sous forme de dérivés (généralement en EM). Nous avons utilisé une phase stationnaire normale correspondant à un gel de silice imprégné de nitrate d'argent ( $AgNO_3$ ). Il s'agit de l'une des méthodes chromatographiques les plus utilisées pour purifier les lipides et autres composés en fonction du degré d'insaturation.

Le principe de la chromatographie  $Ag^+/SiO_2$  est assez simple. Les électrons  $\pi$  des doubles liaisons des AGI (ou des chaînes acyles des lipides) fixent réversiblement les ions  $Ag^+$  pour former des complexes polaires, les insaturations agissant comme donneurs d'électrons et les ions  $Ag^+$  comme accepteurs (Figure 2-19) (Morris, 1966).

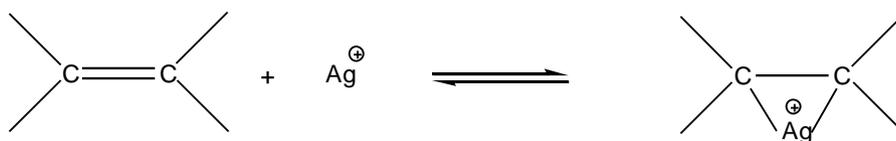


Figure 2-19 : Complexe formé entre l'ion  $Ag^+$  et une double liaison

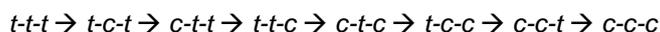
La stabilité du complexe, formé entre les ions  $Ag^+$  et les insaturations, va varier en fonction de plusieurs paramètres :

- Le nombre de doubles liaisons et la longueur de chaîne des AG

La stabilité du complexe augmente avec le degré d'insaturation croissant mais diminue avec l'augmentation de la longueur de chaîne. La chromatographie en présence d' $AgNO_3$  permet donc de séparer les AG selon leur taux d'insaturation (AGS, AGMI, AGDI...). Plus ils sont insaturés, plus ils sont élués tardivement.

- La configuration des doubles liaisons

Pour un même AG, les isomères *cis* sont plus stables que les *trans*. La chromatographie sur  $Ag^+$  s'est révélée très intéressante dans la séparation de mélanges complexes d'isomères géométriques d'AGPI. Ainsi, par exemple, les 8 isomères géométriques de l'ALA (9,12,15-18:3) sont séparés par CLHP- $Ag^+$  selon l'ordre d'élution suivant (Juanéda *et al.*, 1994) :



- La présence de liaisons conjuguées

Les AGC forment des complexes moins stables avec les ions  $\text{Ag}^+$  que leurs analogues non conjugués (dont les doubles liaisons sont interrompues par un ou plusieurs groupements méthylènes), ils peuvent alors être séparés de ces derniers.

La chromatographie sur  $\text{Ag}^+$  offre donc de réels avantages pour analyser et purifier des mélanges complexes d'AG. L'utilisation en série de colonnes CLHP- $\text{Ag}^+$  a permis par exemple de séparer un mélange d'ALC (7,9 ; 8,10 ; 9,11 ; 10,12 ; 11,13-18:2) à la fois en fonction de la configuration et des positions des insaturations (Roach *et al.*, 2002). L'ordre d'élué des différents ALC permet de distinguer trois groupes élués par ordre croissant et constitués des isomères :

1/  $t_{11}, t_{13} \rightarrow t_{10}, t_{12} \rightarrow t_9, t_{11} \rightarrow$  et  $t_8, t_{10}$

2/  $c_{11}, t_{13} \rightarrow t_{11}, c_{13} \rightarrow c_{10}, t_{12} \rightarrow t_{10}, c_{12} \rightarrow c_9, t_{11} \rightarrow t_9, c_{11} \rightarrow c_8, t_{10} \rightarrow t_8, c_{10} \rightarrow t_7, c_9$

3/  $c_{11}, c_{13} \rightarrow c_{10}, c_{12} \rightarrow c_9, c_{11} \rightarrow c_8, c_{10}$

Il apparaît clairement dans cette étude que les isomères  $t,t$  sont élués en premier, suivi d'un mélange d'isomères  $c,t$  et  $t,c$  puis des isomères  $c,c$ . De même, les ALC sont également séparés en fonction de la position des doubles liaisons conjuguées. Plus les insaturations des AG sont proches de la fonction carboxylique, plus l'élué sera retardée. Ainsi, les derniers AG élués sont ceux présentant leurs insaturations en C-7 et C-9.

En CLHP- $\text{Ag}^+$ , la phase mobile correspond à des solvants ou mélanges de solvants apolaires et la séparation s'effectue par polarité croissante. Pour notre étude, la détection a été réalisée par spectrophotomètre UV (Ultraviolet à longueur d'onde réglable) à 215 nm. La séparation des EMAG est visualisée sous forme de pics dont l'absorbance est proportionnelle à l'aire de la surface avec la courbe et la ligne de base. L'efficacité de la séparation des EMAG dépend de la qualité des chromatogrammes qui doivent présenter des pics symétriques et bien espacés pour éviter le recouvrement, mais aussi de la durée de l'élué et de la quantité de produit injecté.

## II-4-7- Activités biologiques

L'évaluation pharmacologique a concerné l'étude de l'activité cytotoxique d'un des AGC. L'action sur la viabilité cellulaire a été testée sur plusieurs lignées cancéreuses : KB, myélome multiple, glioblastome primaire et cancer du colon. Les activités cytotoxiques sur cellules KB (carcinome épidermoïde de rhinopharynx) ont été réalisées au Laboratoire par le test colorimétrique au MTT. Les analyses sur les trois autres types de lignées ont été réalisées au Département de Recherche en Cancérologie (unité Inserm U601) de la Faculté de Médecine de Nantes par le test colorimétrique au rouge neutre. Le myélome multiple est une prolifération maligne des plasmocytes, initialement localisée au niveau de la moelle osseuse. Le glioblastome multiforme correspond à une tumeur maligne du système nerveux qui représente chez l'adulte la forme la plus fréquente de tumeur cérébrale.

### II-4-7-1- Cytotoxicité par le test colorimétrique au MTT

L'activité cytotoxique sur cellules KB a été étudiée par le test colorimétrique au MTT qui mesure l'activité mitochondriale. Le MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) est un sel hydrosoluble de couleur jaune qui, en présence des déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes, est réduit en cristaux de formazan, insolubles et de couleur pourpre par clivage du noyau

tétrazolium (Mosman, 1983; Denizot et Lang, 1986). Après incubation, ces derniers sont dissous dans du tampon de lyse (isopropanol, HCl 1M 0,04%) pour donner une teinte violette. Lorsque les cellules sont mortes, la conversion du MTT en cristaux de formazan ne se fait pas et aucune teinte n'est décelée.

### Mode opératoire

Les cellules KB (ATCC CCL 17) sont cultivées en flasques de 75 cm<sup>2</sup> à 37°C sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> (5%) dans du milieu de base d'Eagle (Eagle's Basal Medium) supplémenté en sérum de veau fœtal (5%, v/v), glutamine (200 mM, 1%, v/v) et streptomycine/pénicilline (10 mg/mL, 1%, v/v).

Après une période d'incubation de 48 h, les cellules sont trypsinées puis mises en suspension dans du BME à raison d'une suspension cellulaire de 200000 cellules/mL. Les microplaques sont alors préparées avec 50 µL de suspension cellulaire par puits puis mises à incuber pendant 48 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) pour permettre aux cellules d'adhérer au fond de chaque puits et d'avoir un tapis cellulaire homogène. Les échantillons à tester (50 µL) sont ajoutés à chaque puits (trois réplicats). Des puits témoins sont réalisés avec une solution de méthanol à 10% dans le milieu de culture qui correspond au solvant des solutions des échantillons à tester.

Après 72 heures d'incubation, 50 µL de MTT (5 mg/mL) sont additionnés dans chaque puits et laissés incubés pendant 3 h puis le mélange milieu de culture/MTT est ôté et 100 µL de tampon de lyse sont ajoutés. Après solubilisation complète sous agitation des cristaux de formazan, les absorbances sont lues à 570 nm auxquelles sont retranchées celles à 630 nm, qui correspondent au bruit de fond.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire est calculé par la formule :

$$[1 - (A_{\text{échantillon}} / A_{\text{témoin}})] \times 100$$

## II-4-7-2- Cytotoxicité par le test de colorimétrique au rouge neutre

L'activité cytotoxique sur myélome multiple, glioblastome multiforme et cancer du colon a été étudiée par le test d'incorporation du rouge neutre. Le colorant rouge neutre faiblement cationique pénètre dans les membranes cellulaires par diffusion et va se lier aux groupements carboxyliques et phosphates des lysosomes. Après incubation, la cytotoxicité est exprimée comme la diminution de la fixation du colorant vital rouge neutre en fonction de la concentration des produits à tester (Borenfreund et Puerner, 1985). Ainsi, lorsque les cellules sont viables et les produits inactifs, une coloration rouge est observée.

### Mode opératoire

Les cellules KMS-11 (lignée cellulaire adhérente de myélome multiple) GBM (culture primaire de cellules de glioblastome multiforme) et de colon (lignée cellulaire d'adénocarcinome LS174T) sont cultivées à 37°C sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> (5%) dans du milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium). Le milieu est supplémenté en sérum de veau fœtal (5% à 10% selon les lignées, v/v), glutamine (2 mM), pénicilline (100 UI/mL), streptomycine (100 µg/mL) et 2-β-mercaptoéthanol (10 µM).

Lorsque les cellules arrivent à 70-80% de confluence, elles sont trypsinées puis mises en suspension dans du milieu de culture afin de préparer les microplaques à 96 puits à raison de 20000 cellules par puits. Les microplaques sont mises à incuber 24 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) pour permettre aux cellules d'adhérer au fond de chaque puits. Les échantillons à tester et les témoins sont ajoutés puis les microplaques sont mises à incuber pendant 48 h. Le rouge neutre, dilué à 50 µg/mL dans le milieu de culture, est alors ajouté à chaque puits et laissé à incuber pendant 3 h. Le milieu de culture est ensuite retiré, les cellules sont fixées avec un mélange formaldéhyde (1%)/chlorure de calcium (1%) et le colorant extrait avec 0,2 mL d'acide acétique dans l'éthanol 50%. Les microplaques sont ensuite laissées toutes une nuit à 4°C puis lues à 570 nm et corrigées avec un blanc.

## P2-III- Lipides fongiques : résultats obtenus

Nous exposerons dans cette partie, dans un premier temps, les rendements de production lipidique et les proportions relatives des différentes classes de lipides obtenues puis, dans un deuxième temps, les compositions en AG et ce pour les quatre champignons étudiés, provenant des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire. Ces études ont été entreprises en réalisant des cultures sur milieu solide. Néanmoins, une étude supplémentaire de production lipidique et de composition en AG a également été réalisée à partir de milieu liquide de fermentation pour le champignon *Trichoderma longibrachiatum*. Pour cette souche seront présentés les résultats obtenus successivement lors des cultures en milieu solide puis celles en milieu liquide.

### III-1- Obtention des lipides totaux et séparation en classes lipidiques

#### III-1-1- *Trichoderma longibrachiatum* et *T. harzianum*

Les productions lipidiques de *T. longibrachiatum* cultivé en milieu solide et en milieu liquide ainsi que la séparation des lipides totaux en classes sont présentées Tableau 2-4.

**Tableau 2-4 : Production lipidique de *T. longibrachiatum* à partir de cultures réalisées en milieu solide et liquide**

Type de culture	Biomasse (g/L)	Lipides dans la biomasse (% pds/pds)	Classes de lipides (% massique)		
			Lipides neutres (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Glycolipides (acétone)	Phospholipides (méthanol)
Solide	8,3 ± 1,3	9,9 ± 1,8	58,1 ± 7,3	12,3 ± 3,8	29,6 ± 5,5
Liquide	0,8 ± 0,3	10,0 ± 0,7	21,0 ± 5,1	12,2 ± 3,5	66,8 ± 6,0

Les données correspondent aux moyennes réalisées sur 3 cultures

Après 10 jours de culture sur milieu DCA, la biomasse est évaluée à 8,3 g/L de culture. Les lipides totaux correspondent à 10% de cette biomasse. Les lipides neutres (fraction dichlorométhane de la chromatographie sur colonne ouverte) correspondent à la classe lipidique majoritaire, suivie des PL. Les glycolipides représentent la classe lipidique minoritaire.

Le rendement de la biomasse produite à partir des cultures réalisées en milieu liquide est dix fois moins important qu'en milieu solide pour une proportion lipidique semblable (10%). En ce qui concerne les proportions relatives des trois classes lipidiques, pour les deux procédés, les glycolipides représentent la classe lipidique minoritaire, par contre les PL sont plus abondants que les lipides apolaires à partir des cultures réalisées en milieu liquide.

Le rendement de culture, la proportion des lipides totaux et la composition lipidique relatifs aux cultures en milieu solide de *T. harzianum* sont résumés Tableau 2-5.

**Tableau 2-5 : Production lipidique de *T. harzianum* à partir de cultures réalisées en milieu solide**

Biomasse (g/L)	Lipides dans la biomasse (% pds/pds)	Classes de lipides (% massique)		
		Lipides neutres (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Glycolipides (acétone)	Phospholipides (méthanol)
18,1	5,5	44,1	14,0	41,9

Le rendement de la biomasse produite chez cette souche atteint 18 g/L de culture pour une proportion de lipides inférieure à 6%. Les lipides apolaires et les PL présentent des proportions relatives similaires alors que les glycolipides sont minoritaires.

### III-1-2- *Penicillium vermiculatum* et *P. citreonigrum*

Les résultats obtenus pour *P. vermiculatum* montrent un rendement de biomasse assez élevé de 45 g par litre de culture (Tableau 2-6).

**Tableau 2-6 : Production lipidique de *P. vermiculatum* à partir de cultures réalisées en milieu solide**

Biomasse <sup>1</sup> (g/L)	Classes de lipides (% massique)			
	Lipides dans la biomasse (%, pds/pds)	Lipides neutres (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Glycolipides (acétone)	Phospholipides (méthanol)
44,9 ± 4,0	8,6 ± 1,3	37,8 ± 2,8	27,9 ± 4,6	32,3 ± 4,9

Les données correspondent aux moyennes réalisées sur deux cultures

Les lipides totaux représentent moins de 10 % de la biomasse produite à partir des cultures sur milieu solide. Cette souche est caractérisée par 3 classes lipidiques en proportions voisines, comprises entre 27,9 et 37,8%. En ce qui concerne *P. citreonigrum*, la biomasse séparée de la gélose a été évaluée à 33 g/L de culture (Tableau 2-7).

**Tableau 2-7 : Production lipidique de *P. citreonigrum* à partir de cultures réalisées en milieu solide**

Biomasse (g/L)	Classes de lipides (% massique)			
	Lipides dans la biomasse (%, pds/pds)	Lipides neutres (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Glycolipides (acétone)	Phospholipides (méthanol)
33,2	15,6	80,8	3,1	16,1

Les lipides totaux représentent 15,6% de la biomasse. Cette souche présente une forte proportion de lipides apolaires. En effet, sur les 6 g de lipides totaux obtenus après l'étape extractive, l'ensemble des fractions éluées avec le dichlorométhane lors de la séparation des lipides en classes correspondaient à une masse de 4,7 g dont 4,1 exclusivement à des TG ! Cette forte proportion de TG (70% des lipides totaux) est responsable de la consistance huileuse orangée des lipides totaux (Figure 2-20).



**Figure 2-20 : Aspect huileux des lipides totaux de *P. citreonigrum***

## III-2- Etude des acides gras

Pour les différentes souches étudiées, les AG ont été analysés en fonction de leur comportement chromatographique en phase gazeuse sous deux formes de dérivés, les EM et les NAP. Les résultats de composition en AG sont présentés ci-après souche après souche. Les AG identifiés pour les différents échantillons analysés (lipides totaux, TG, PL) sont présentés suivant leur temps de rétention croissant en CPG.

Les compositions en AGT et en AGPL ont été étudiées chez *Trichoderma longibrachiatum* à partir de cultures réalisées sur milieu solide (DCA) et sur milieu liquide (GLP). Dans les deux paragraphes qui suivent seront donc présentés les résultats globaux obtenus pour les deux types de culture. Trois réplicats ont été effectués pour chacun des procédés de fermentation, contrairement aux autres souches (*T. harzianum*, *P. vermiculatum* et *P. citreonigrum*).

### III-2-1- *Trichoderma longibrachiatum*

#### III-2-1-1- Culture en milieu solide

Les AGT obtenus par saponification représentent 16,5% des lipides totaux (pds/pds). Au niveau des PL, les AG libérés lors de la transestérification (EM) correspondent en rapport pds/pds à 12% des lipides totaux. La composition en AG des échantillons de lipides totaux et de PL à partir des cultures réalisées en milieu solide de *T. longibrachiatum* est présentée Tableau 2-8, page suivante.

**Tableau 2-8 : Composition en acides gras totaux et des phospholipides de *T. longibrachiatum* cultivé en milieu solide**

Acides gras		LCE	Lipides totaux	Phospholipides
Tétradécanoïque	14:0	14,00	0,50 ± 0,04	0,40 ± 0,10
Pentadécanoïque	15:0	15,00	1,27 ± 0,03	0,63 ± 0,11
9-Hexadécénoïque	9-16:1	15,79	2,12 ± 0,02	0,73 ± 0,30
Hexadécanoïque	16:0	16,00	19,07 ± 0,73	17,21 ± 1,40
9,12-Heptadécadiénoïque	9,12-17:2	16,64	0,58 ± 0,04	0,41 ± 0,05
9-Heptadécénoïque	9-17:1	16,86	0,71 ± 0,10	0,28 ± 0,12
Heptadécanoïque	17:0	17,00	1,07 ± 0,06	0,47 ± 0,10
9,12-Octadécadiénoïque	9,12-18:2	17,66	34,96 ± 0,66	40,29 ± 1,43
9-Octadécénoïque	9-18:1	17,79	17,47 ± 0,48	33,91 ± 3,42
Octadécanoïque	18:0	18,00	10,65 ± 0,40	2,60 ± 0,17
Octadécadiénoïque	cj-18:2	18,12	2,13 ± 0,47	-
Octadécadiénoïque	cj-18:2	18,20	1,55 ± 0,29	0,11 ± 0,01
Octadécatriénoïque	cj-18:3	18,33	tr.	-
Octadécadiénoïque	cj-18:2	18,40	0,25 ± 0,08	-
Octadécadiénoïque	cj-18:2	18,54	0,58 ± 0,20	0,37 ± 0,02
Octadécatriénoïque	cj-18:3	18,59	tr.	-
Nonadécanoïque	n-19:0	19,00	0,52 ± 0,09	-
2-Hydroxyoctadécanoïque	2-OH-18:0	19,12	0,59 ± 0,28	0,61 ± 0,03
Octadécatriénoïque	cj-18:3	19,49	0,24 ± 0,18	-
Octadécatriénoïque	cj-18:3	19,55	0,22 ± 0,15	0,19 ± 0,03
11,14-Eicosadiénoïque	11,14-20:2	19,65	0,13 ± 0,01	-
11-Eicosadécénoïque	11-20:1	19,79	0,10 ± 0,00	-
Eicosanoïque	20:0	20,00	0,40 ± 0,05	-
Heneicosanoïque	21:0	21,00	0,13 ± 0,02	-
Docosanoïque	22:0	22,00	0,16 ± 0,03	0,32 ± 0,03
Tricosanoïque	23:0	23,00	0,12 ± 0,02	-
Tétracosanoïque	24:0	24,00	0,99 ± 0,22	0,10 ± 0,01
Pentacosanoïque	25:0	25,00	0,19 ± 0,01	-
2-Hydroxytétracosanoïque	2-OH-24:0	25,25	2,89 ± 0,14	0,99 ± 0,18
Hexacosanoïque	26:0	26,00	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,03
2-Hydroxypentacosanoïque	2-OH-25:0	26,28	0,17 ± 0,01	0,11 ± 0,02
2-Hydroxyhexacosanoïque	2-OH-26:0	27,28	tr.	0,10 ± 0,03
Octacosanoïque	28:0	28,00	tr.	-

cj : conjugué, tr. : trace, < 0,1%

Un plus grand nombre d'AG ont été identifiés dans les échantillons provenant des lipides totaux (34) par rapport aux PL (20) notamment pour certains AG à longue chaîne seulement présents dans les lipides totaux (19:0, 20:2, 20:1, 20:0, 21:0, 23:0, 25:0 et 28:0). Les AG majoritairement observés dans les lipides totaux correspondent, par ordre décroissant, aux acides linoléique, palmitique, oléique et stéarique (en Annexe 2 est présenté le courant ionique total du chromatogramme CPG).

Chez les PL, deux différences importantes ont pu être remarquées concernant les acides oléique et stéarique. Alors que le premier est présent en quantité importante aussi bien dans les lipides totaux que les PL, le second est deux fois plus abondant dans les PL.

D'autres AG ont été identifiés minoritairement aussi bien dans les lipides totaux que dans les PL comme le 14:0, 15:0, 9-16 1, 9,12-17:2, 9-17:1, 17:0.

Quatre 2-OH-AG ont été identifiés à partir des cultures solides, respectivement de 18, 24, 25 et 26 carbones. Le spectre de l'EM de l'acide 2-hydroxyhexacosanoïque (2-OH-26:0) est présenté Figure 2-21.

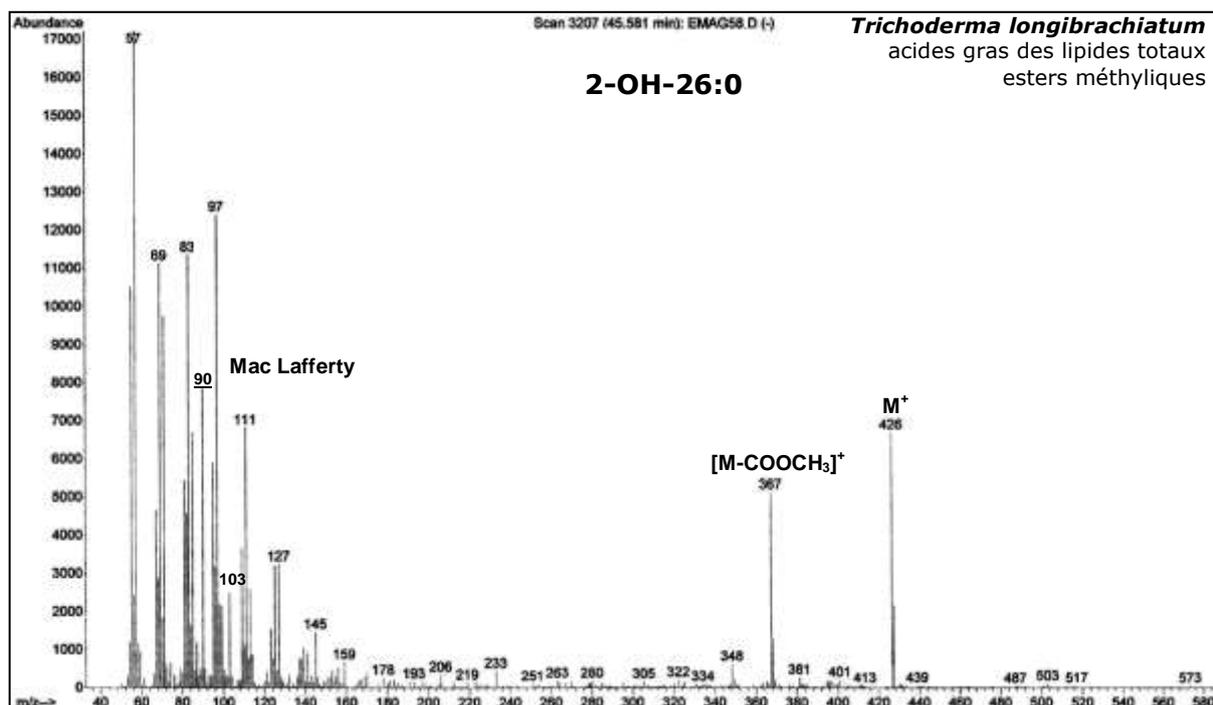


Figure 2-21 : Spectre de l'EM de l'acide 2-hydroxyhexacosanoïque

L'hydroxysubstitution en position 2 est confirmée par la présence des ions diagnostics  $m/z$  90 (Mac Lafferty) et  $m/z$  103. L'ion moléculaire  $M^+$  ( $m/z$  426) apparaît nettement, accompagné du pic  $[M-59]^+$  à  $m/z$  367 caractéristique des 2-hydroxysubstitutions.

Des AGC ont été identifiés à partir des cultures solides. Il s'agit de différents isomères d'AL et ALn qui ont la particularité d'être élués après l'acide stéarique et jusqu'à l'acide eicosadiénoïque (20:2). Ces AGC sont plus importants en nombre et en proportions dans les lipides totaux que dans les PL. En effet, quatre isomères d'ALC et quatre d'ALnC ont été identifiés dans les lipides totaux contre deux et un uniquement dans les PL. Les plus importants d'entre eux correspondent aux ALC élués juste après l'EM de l'acide stéarique (LCE respectives de 18,12 et 18,20) qui représentent au total plus de 3,5% des AGT. Les spectres de masse de leur EM sont présentés Figure 2-15 (page 69) et Figure 2-16 (page 70).

Les quatre ALnC identifiés dans les lipides totaux sont moins abondants que leurs correspondants diinsaturés. Le spectre de masse de l'EM de l'ALnC (LCE = 19,49), détecté uniquement au niveau des lipides totaux, est présenté Figure 2-22, page suivante.

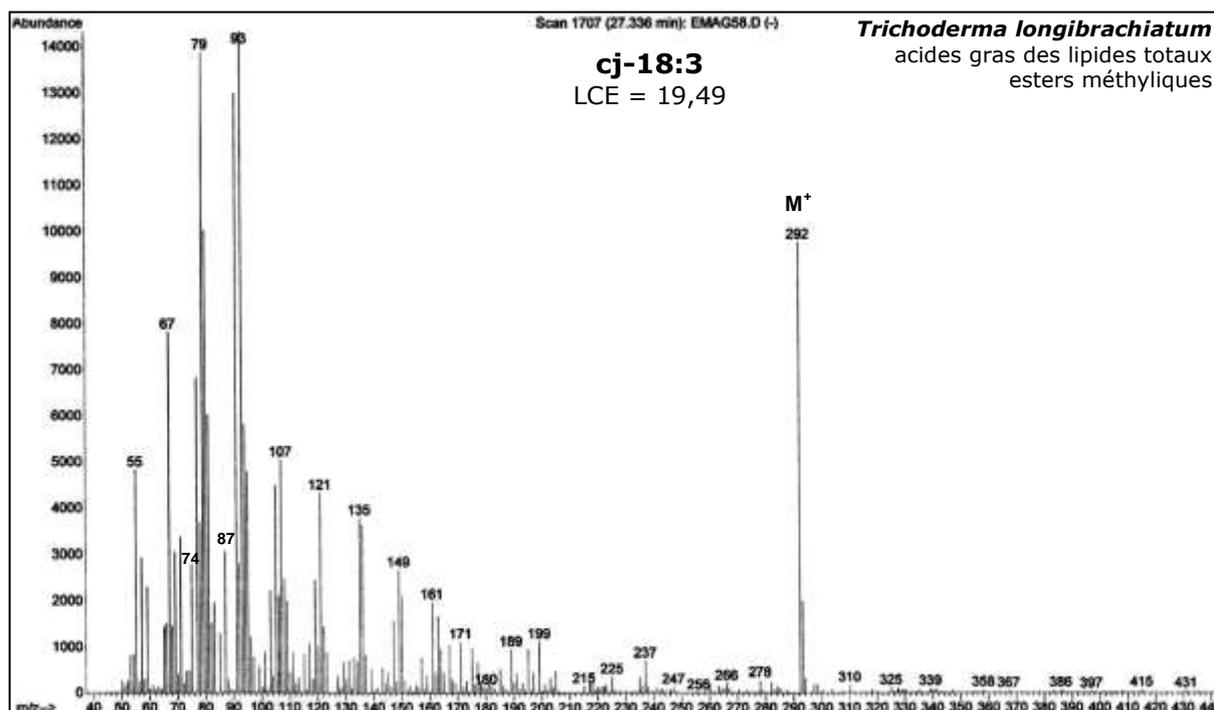


Figure 2-22 : Spectre de masse de l'EM de l'acide octadécatriénoïque conjugué (LCE = 19,49)

Les mêmes constats sont effectués pour cet AG, comme c'est le cas pour le spectre présenté Figure 2-19 : abondance de l'ion moléculaire  $M^+$ , le pic  $[M-31]^+$  est ici pratiquement invisible.

### III-2-1-2- Culture en milieu liquide

Les AG identifiés à partir des échantillons de lipides totaux et de PL sont présentés page suivante (Tableau 2-9). Ils représentent respectivement 32,5 et 27% (pds/pds) des lipides totaux.

Trente-sept AG ont été identifiés à partir des cultures liquides de *T. longibrachiatum*, comprenant de 14 à 30 carbones. Quelques variations dans la composition en AG sont observées entre lipides totaux et PL. Les mêmes AG majoritaires sont observés pour les deux types de lipides : acides linoléique, palmitique, oléique et stéarique.

Néanmoins, les proportions de l'acide palmitique sont moins importantes dans les lipides totaux que dans les PL, contrairement à l'acide stéarique et à l'acide palmitoléique, plus important dans les lipides totaux que dans les PL.

De faibles proportions des acides 14:0, 15:0, 9-16:1, 9,12-17:2, 9-17:1, 17:0, 20:2, 20:1, 20:0, 22:0, 24:0, 25:0 et 26:0 sont observés dans les deux cas. Les AG à longues et très longues chaînes sont observés aussi bien chez les lipides totaux que les PL. Cependant une faible différence est observée pour les lipides totaux où l'on note en plus la présence des acides 19:0, 23:0, 28:0 et 30:0. Le spectre de l'EM de l'acide triacontanoïque est présenté Figure 2-23, page 84.

Tableau 2-9 : Composition en acides gras totaux et des phospholipides de *T. longibrachiatum* cultivé en milieu liquide

Acides gras		LCE	Lipides totaux	Phospholipides
Tétradécanoïque	14:0	14,00	0,55 ± 0,26	0,33 ± 0,20
Pentadécanoïque	15:0	15,00	0,63 ± 0,20	0,84 ± 0,37
9-Hexadécénoïque	9-16:1	15,79	2,56 ± 0,15	1,25 ± 0,89
Hexadécanoïque	16:0	16,00	20,46 ± 0,93	28,13 ± 1,95
9,12-Heptadécadiénoïque	9,12-17:2	16,64	0,57 ± 0,12	tr.
9-Heptadécénoïque	9-17:1	16,86	tr.	0,19 ± 0,09
Heptadécanoïque	17:0	17,00	0,64 ± 0,02	0,51 ± 0,24
9,12-Octadécadiénoïque	9,12-18:2	17,66	38,16 ± 2,63	46,07 ± 5,26
Octadéc-9-énoïque	9-18:1	17,79	13,54 ± 2,69	15,27 ± 0,75
Octadécanoïque	18:0	18,00	10,43 ± 1,02	4,58 ± 1,95
Octadécatriénoïque	cj-18:3	18,05	0,46 ± 0,16	-
Octadécadiénoïque	cj-18:2	18,12	4,60 ± 1,81	0,35 ± 0,05
Octadécadiénoïque	cj-18:2	18,20	1,77 ± 1,65	-
Octadécatriénoïque	cj-18:3	18,25	0,50 ± 0,21	-
Octadécatriénoïque	cj-18:3	18,33	0,21 ± 0,07	0,10 ± 0,02
Octadécadiénoïque	cj-18:2	18,40	0,33 ± 0,16	0,25 ± 0,05
Octadécadiénoïque	cj-18:2	18,54	0,51 ± 0,23	0,14 ± 0,05
Octadécatriénoïque	cj-18:3	18,59	0,12 ± 0,03	-
Octadécatriénoïque	cj-18:3	18,79	0,12 ± 0,04	-
Nonadécanoïque	19:0	19,00	0,35 ± 0,04	-
Octadécatriénoïque	cj-18:3	19,06	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02
Octadécatriénoïque	cj-18:3	19,08	0,11 ± 0,00	tr.
2-Hydroxyoctadécanoïque	2-OH-18:0	19,12	0,33 ± 0,02	tr.
Octadécatriénoïque	cj-18:3	19,41	tr.	-
Octadécatriénoïque	cj-18:3	19,49	0,13 ± 0,01	0,27 ± 0,02
Octadécatriénoïque	cj-18:3	19,55	0,15 ± 0,06	-
11,14-Eicosadiénoïque	11,14-20:2	19,65	0,10 ± 0,01	0,15 ± 0,02
11-Eicosadécénoïque	11-20:1	19,79	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,03
Eicosanoïque	20:0	20,00	0,17 ± 0,06	0,36 ± 0,04
Docosanoïque	22:0	22,00	tr.	0,15 ± 0,02
Tricosanoïque	23:0	23,00	tr.	-
Tétracosanoïque	24:0	24,00	1,30 ± 0,55	0,36 ± 0,15
Pentacosanoïque	25:0	25,00	0,10 ± 0,03	0,12 ± 0,02
2-Hydroxytétracosanoïque	2-OH-24:0	25,25	0,13 ± 0,00	0,14 ± 0,07
Hexacosanoïque	26:0	26,00	0,57 ± 0,06	0,14 ± 0,07
Octacosanoïque	28:0	28,00	tr.	-
Triacotanoïque	30:0	30,00	tr.	-

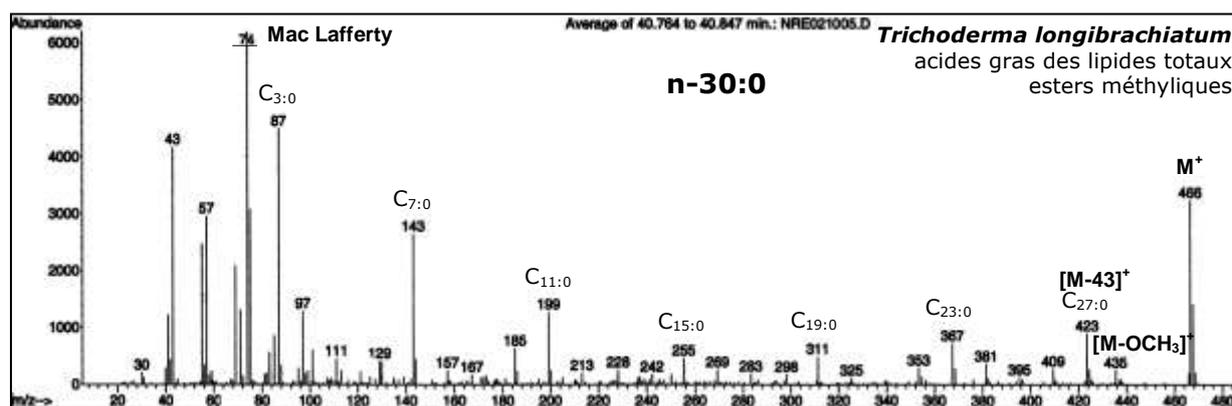


Figure 2-23 : Spectre de masse de l'EM de l'acide triacontanoïque

Nous sommes bien en présence d'un AGS compte tenu des ions principaux  $m/z$  74 (Mac Lafferty) et 87. L'ion moléculaire  $M^+$  à  $m/z$  466 est nettement visible accompagné des pics diagnostics  $[M-43]^+$  et  $[M-31]^+$  à  $m/z$  423 et 453 respectivement. Pratiquement tous les ions fragments de type  $[CH_3COO(CH_2)_n]^+$  sont observés exceptés ceux en  $C_{5:0}$ ,  $C_{9:0}$ ,  $C_{14:0}$  et  $C_{29:0}$ .



Les acides 2-OH-18:0 et 2-OH-24:0 sont présents aussi bien dans les lipides totaux que dans les PL.

Les principales différences entre AGT et AGPL interviennent principalement au niveau des AGC, comme nous venons de le voir à partir des cultures de *T. longibrachiatum* réalisées en milieu solide. Dans les lipides totaux, 14 AGC représentant 9% au total des AGT, ont été mis en évidence, correspondant à des isomères d'AL et d'ALn. Chez les PL, seulement sept sur les 14 AG présents dans les lipides totaux ont été observés et représentent seulement 1,2% des AGPL. Les AGC majoritaires correspondent aux deux ALC élus juste après l'acide stéarique (LCE = 18,12 et 18,20) qui représentent respectivement 4,6 et 1,8% des AGT.

### III-2-2- *Trichoderma harzianum*

Les AG identifiés à partir des échantillons de lipides totaux et de PL sont présentés Tableau 2-10. Les AGT (AG libres) représentent 40% et les AGPL (EM) 16% des lipides totaux.

**Tableau 2-10 : Composition en acides gras totaux et des phospholipides de *T. harzianum***

Acides gras		LCE	Lipides totaux	Phospholipides
Dodécanoïque	12:0	12,00	0,10	0,13
Tétradécanoïque	14:0	14,00	0,57	0,33
12-Méthyltétradécanoïque	<i>ai</i> -15:0	14,71	tr.	-
Pentadécanoïque	15:0	15,00	3,00	1,26
9,12-Hexadécadiénoïque	9,12-16:2	15,63	tr.	-
9-Hexadécénoïque	9-16:1	15,79	4,56	0,87
Hexadécanoïque	16:0	16,00	20,20	19,21
9,12-Heptadécadiénoïque	9,12-17:2	16,69	0,68	0,33
9-Heptadécénoïque	9-17:1	16,84	1,01	0,82
Heptadécanoïque	17:0	17,00	1,75	0,73
9,12-Octadécadiénoïque	9,12-18:2	17,66	39,42	51,03
9-Octadécénoïque	9-18:1	17,83	5,72	20,10
Octadécanoïque	18:0	18,00	8,26	2,19
Octadécatriénoïque	<i>cj</i> -18:3	18,05	0,39	-
Octadécadiénoïque	<i>cj</i> -18:2	18,11	3,27	1,03
Octadécadiénoïque	<i>cj</i> -18:2	18,19	2,99	0,21
Octadécadiénoïque	<i>cj</i> -18:2	18,49	0,33	-
Nonadécénoïque	19:1	18,73	0,11	-
Octadécatriénoïque	<i>cj</i> -18:3	18,95	tr.	-
Nonadécanoïque	19:0	19,00	tr.	-
Octadécatriénoïque	<i>cj</i> -18:3	19,05	0,95	-
Octadécatriénoïque	<i>cj</i> -18:3	19,09	0,60	-
2-Hydroxyoctadécanoïque	2-OH-18:0	19,13	0,37	0,23
Octadécatriénoïque	<i>cj</i> -18:3	19,49	0,25	0,12
Octadécatriénoïque	<i>cj</i> -18:3	19,55	0,59	0,17
11,14-Eicosadiénoïque	11,14-20:2	19,67	0,21	-
11-Eicosadécénoïque	11-20:1	19,74	tr.	-
Eicosanoïque	20:0	20,00	0,63	0,16
Docosanoïque	22:0	22,00	0,51	0,31
Tricosanoïque	23:0	23,00	0,28	-
Tétracosanoïque	24:0	24,00	1,28	0,56
Pentacosanoïque	25:0	25,00	0,42	-
2-Hydroxytétracosanoïque	2-OH-24:0	25,27	0,14	0,10
Hexacosanoïque	26:0	26,00	0,42	-
2-Hydroxytétracosanoïque	2-OH-25:0	26,27	-	0,11
Heptacosanoïque	27:0	27,00	tr.	-
Octacosanoïque	28:0	28,00	0,17	-
Nonacosanoïque	29:0	29,00	0,67	-
Triacotanoïque	30:0	30,00	0,15	-
Dotriacotanoïque	32:0	32,00	tr.	-

Quarante AG ont été identifiés chez *T. harzianum*, avec un nombre de carbones compris entre 12 et 32. Les compositions en AG sont très différentes entre lipides totaux et PL. Moins d'AG ont été identifiés dans les PL (19) par rapport aux lipides totaux (39). Toutefois, les mêmes AG majoritaires sont observés pour les deux types de lipides : acides linoléique, palmitique et oléique. Notons la proportion de ce dernier

plus importante dans les PL. Les acides stéarique, pentadécanoïque et palmitoléique sont plus abondants dans les lipides totaux que dans les PL. Le courant ionique total du chromatogramme CPG des AG des lipides totaux est présenté Annexe 2.

Dans les échantillons de PL, beaucoup moins d'AG ont été identifiés parmi ceux élués après l'acide stéarique. En effet, contrairement aux lipides totaux où de nombreux AG à longues chaînes ont été identifiés jusqu'à 32 carbones (Figure 2-24), chez les PL seuls les acides 20:0, 22:0 et 24:0 ont été identifiés.

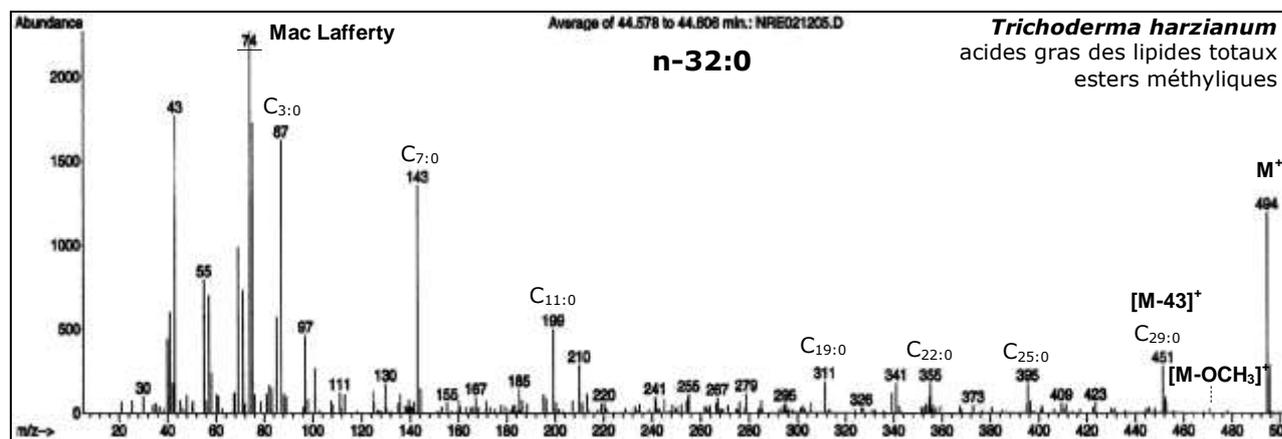


Figure 2-24 : Spectre de masse de l'EM de l'acide dotriacontanoïque

Les pics de base  $m/z$  74 (Mac Lafferty) et 87 sont majoritaires confirmant qu'il s'agit d'un AG saturé. L'ion moléculaire  $M^+$  à  $m/z$  494 apparaît nettement (60%) accompagné du pic diagnostique  $[M-43]^+$  à  $m/z$  451. Plusieurs ions fragments de type  $[CH_3COO(CH_2)_n]^+$  sont observés traduisant les ruptures des liaisons C-C le long de la chaîne aliphatique. Il est intéressant de noter que l'ion fragment  $[M-31]^+$  ( $m/z$  473) n'est pratiquement pas observé. Ce phénomène est d'autant plus visible que le nombre de carbones augmente, dans le cas des très longues chaînes (>24 C).

D'autres AG sont présents seulement au niveau des lipides totaux, c'est le cas des acides *ai*-15:0, 9,12-16:2, 9,12-17:2, 19:1, 11,14-20:2 et 11-20:1.

Plusieurs AGC ont été détectés chez les deux types d'AG. Au niveau des lipides totaux, de nombreux AGC diinsaturés et triinsaturés (ALC et ALnC) ont également été observés, s'étalant de l'acide stéarique jusqu'à l'acide eicosadiénoïque, comme c'était le cas pour *T. longibrachiatum*. On note la présence de trois isomères d'ALC et six d'ALnC dans les AG des lipides totaux. Chez les AGPL le nombre d'AGC détectés est beaucoup moins important, s'élevant au nombre de quatre (deux ALC et deux ALnC).

Trois acides hydroxylés ont été identifiés respectivement à 18, 24 et 25 carbones chez les PL. Les deux premiers sont communs aux lipides totaux.

### III-2-3- *Penicillium vermiculatum*

Chez *P. vermiculatum*, la composition en acides gras des triglycérides (AGTG) a été comparée à celle des PL. (Tableau 2-11). Les AG obtenus par saponification des TG représentent 19,4% des lipides totaux de départ, soit environ deux fois plus que les EMAG libérés lors de la transésterification des PL (8,4%).

**Tableau 2-11 : Composition en acides gras des triglycérides et des phospholipides de *P. vermiculatum***

Acides gras		LCE	Triglycérides	Phospholipides
Tétradécanoïque	14:0	14,00	0,87	0,10
Pentadécanoïque	15:0	15,00	0,74	0,89
9-Hexadécénoïque	9-16:1	15,79	1,72	1,29
Hexadécanoïque	16:0	16,00	18,12	24,49
9,12-Heptadécadiénoïque	9,12-17:2	16,64	0,41	tr.
9-Heptadécénoïque	9-17:1	16,77	0,54	0,40
Heptadécanoïque	17:0	17,00	1,47	0,52
9,12-Octadécadiénoïque	9,12-18:2	17,60	34,80	48,81
9-Octadécénoïque	9-18:1	17,81	10,29	15,40
Octadécanoïque	18:0	18,00	16,65	1,82
Octadécadiénoïque	cj-18:2	18,09	1,42	-
Octadécadiénoïque	cj-18:2	18,16	1,58	-
9-Nonadécénoïque*	9-19:1	18,71	0,08	
10-Nonadécénoïque	10-19:1	18,76	0,11	0,72**
9-Nonadécénoïque*	9-19:1	18,81	0,37	
Nonadécanoïque	19:0	19,00	0,10	-
Octadécatriénoïque	cj-18:3	19,04	-	0,55
Octadécatriénoïque	cj-18:3	19,12	-	0,20
2-Hydroxyoctadécanoïque	2-OH-18:0	19,13	-	0,20
Octadécatriénoïque	cj-18:3	19,32	-	0,50
Octadécatriénoïque	cj-18:3	19,38	-	0,67
11,14-Eicosadiénoïque	11,14-20:2	19,61	0,53	tr.
11-Eicosadécénoïque	11-20:1	19,71	0,43	1,17
Eicosanoïque	20:0	20,00	2,26	tr.
Heneicosanoïque	21:0	21,00	tr.	-
13-Docosadécénoïque	13-22:1	21,72	0,53	tr.
Docosanoïque	22:0	22,00	1,98	tr.
Tricosanoïque	23:0	23,00	0,20	-
14-Tétracosadécénoïque	24:1	23,73	0,19	-
Tétracosanoïque	24:0	24,00	4,67	0,18
Pentacosanoïque	25:0	25,00	0,15	-
2-Hydroxytétracosanoïque	2-OH-24:0	25,25	-	1,94
Hexacosanoïque	26:0	26,00	0,25	-

\* Isomères de configuration *cis* et *trans*

\*\*Un seul isomère détecté, attribution incertaine (9 ou 10-19:1)

Trente-trois AG ont été identifiés chez *P. vermiculatum*, ayant de 14 à 26 carbones (en Annexe 2 est présenté le courant ionique total des AGTG). Des similitudes et des disparités sont observées dans la composition en AGTG et AGPL. Concernant les similitudes, les acides linoléique et palmitique sont les deux AG majoritairement observés dans les TG et les PL. De nombreux AG sont également présents en faibles proportions dans les deux types de lipides comme le 14:0, 15:0, 9-16:1, 9,12-17:2, 9-17:1, 17:0, 9-19:1, 11,14-20:2, 11-20:1, 13-22:1 et le 22:0.

Il est intéressant de préciser que trois isomères de l'acide nonadécénoïque ont été détectés dans les AGTG contre un seul dans les AGPL. Ces trois isomères, de position et/ou de configuration, ont été aussi bien observés à partir des spectres de leur EM que ceux de leur NAP, avec des LCE respectives de 18,71, 18,76 et 18,83. Le spectre de masse du NAP a permis de déterminer la position de l'insaturation pour chacun d'eux (Figure 2-25).

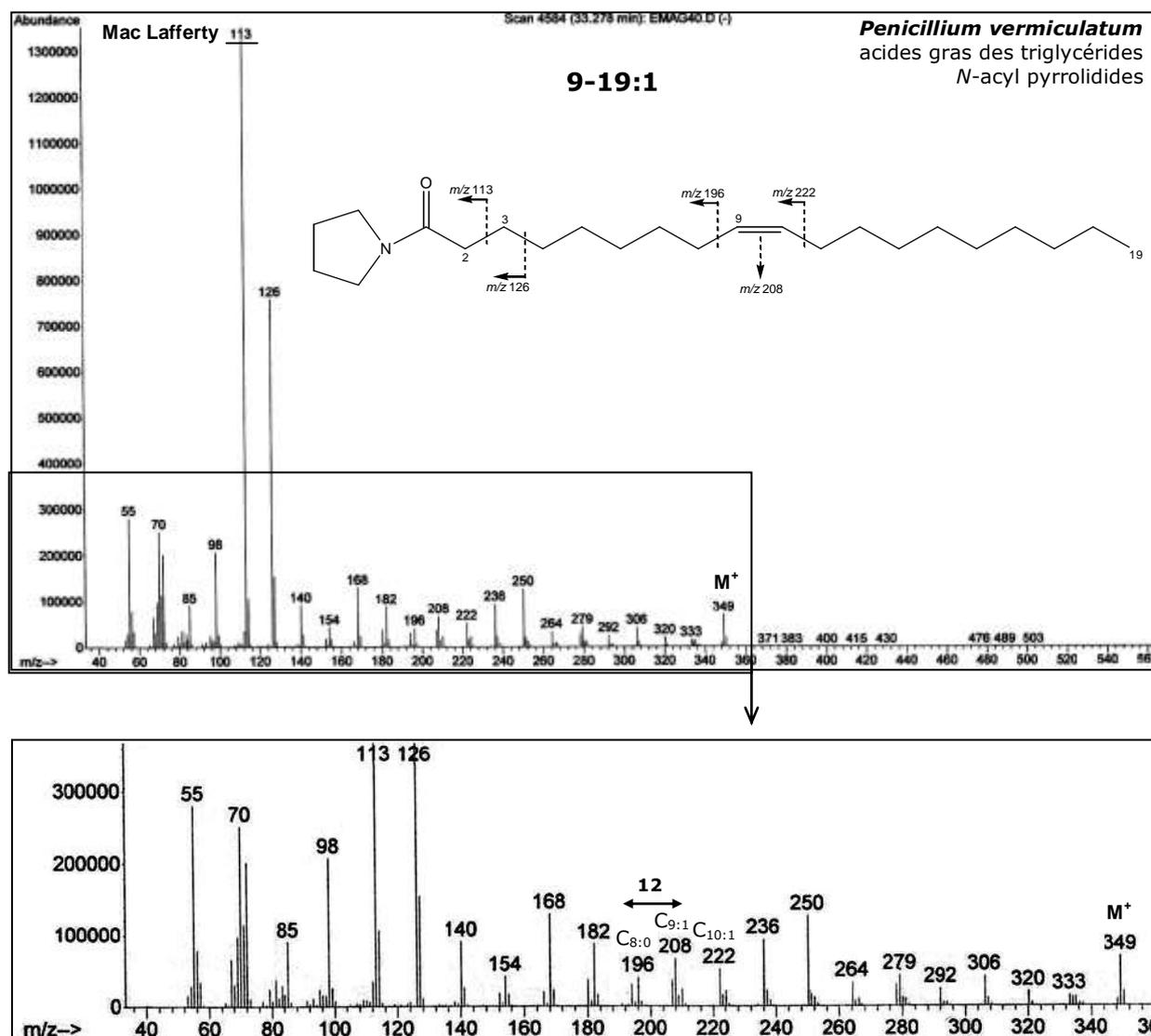


Figure 2-25 : Spectre de masse du NAP de l'acide 9-nonadécénoïque (LCE = 18,83)

Le spectre NAP du 19:1 élué en dernier fait clairement apparaître les fragments correspondant aux clivages le long de la chaîne aliphatique (C<sub>4</sub> à C<sub>18</sub>). L'ion M<sup>+</sup> est identifié à m/z 349, équivalent à l'AGS m/z 351 – 2H, soit une insaturation. Le fragment C<sub>18:1</sub> (m/z 333) est abaissé, traduisant la linéarité de la fin de chaîne. L'insaturation est localisée en C-9/C-10 avec une différence de 12 entre les carbones 8 et 9. Il s'agit donc de l'acide 9-19:1.

Ainsi, les acides 19:1 présentant respectivement les LCE de 18,71 et 18,83 ne peuvent correspondre qu'aux isomères de configuration *c9-* et *t9-*19:1. Le troisième isomère (LCE = 18,76), élué juste après le premier, correspond à un isomère de position, avec l'insaturation en position 10. Nous pouvons aller plus loin dans la caractérisation des deux isomères de configuration en attribuant la configuration *cis* pour le premier (LCE = 18,71) et *trans* pour le second (LCE = 18,83) en se basant sur l'ordre d'élué des isomères commerciaux *c9-* et *t9-*18:1 sur la même colonne CPG apolaire (cf. Figure 2-14a, page 67).

Chez les PL, le spectre du NAP de l'unique isomère détecté (LCE = 18,71) ne permet pas de conclure sur la position de l'insaturation en C-9 ou C-10. En effet, sont présents à la fois les ions fragments  $m/z$  208 et 210.

Revenons à la comparaison des compositions en AGTG et AGPL. De nombreuses disparités apparaissent également. Tout d'abord certains AG sont présents en proportions plus importantes dans les TG par rapport à d'autres pour qui c'est le contraire. C'est ainsi le cas de l'acide oléique qui est très mineur dans les PL (1,4%) alors qu'il dépasse 16% des AGTG. Le même constat est effectué pour l'acide tétracosanoïque qui atteint 4,7% des AGTG alors qu'au niveau des PL, il n'apparaît qu'à l'état de trace, inférieur à 0,1%. L'acide linoléique, bien que majoritaire dans les deux types de lipides, est plus concentré dans les PL.

Les compositions varient également au niveau des AG à longue chaîne, absents des PL comme le 19:0, 21:0, 23:0, 14-24:1 (Figure 2-26, page suivante), 25:0 et 26:0 et des acides hydroxylés en position 2, uniquement observés dans les AGPL (2-OH-18:0 et 2-OH-24:0).

Plusieurs AGC diinsaturés et triinsaturés ont été observés. Il est intéressant de faire remarquer que, chez cette souche, deux isomères d'ALC ont été identifiés (LCE = 18,11 et 18,18) et sont spécifiques aux AGTG alors que les quatre isomères d'ALnC ne sont retrouvés que dans les AGPL (LCE = 19,04, 19,12, 19,32 et 19,38). Le deuxième isomère d'ALnC est d'ailleurs confondu avec l'acide 2-OH-18:0.

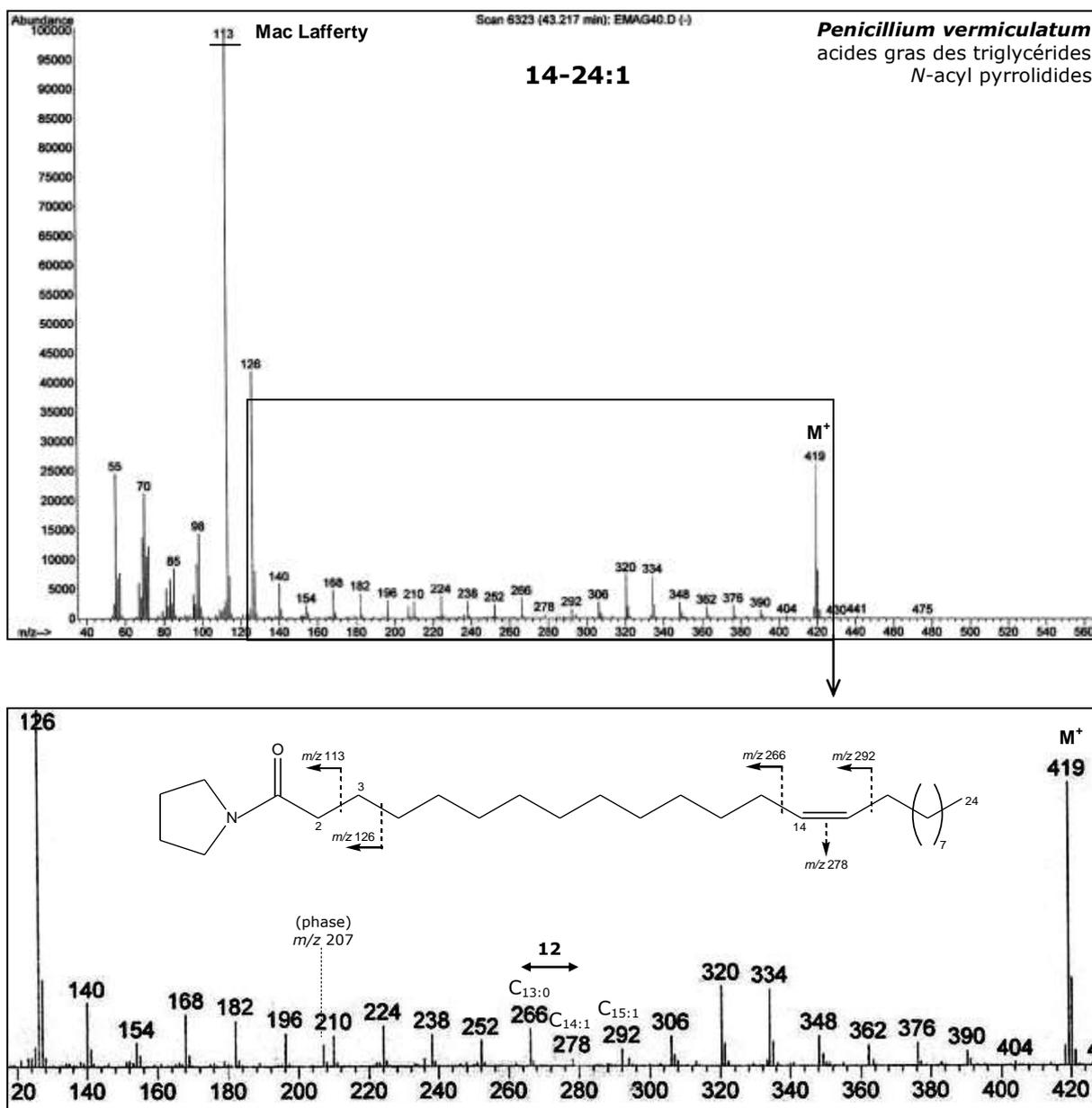


Figure 2-26 : Spectre de masse du NAP de l'acide 14-tétracosénoïque

L'ion M<sup>+</sup> ( $m/z$  419) est significativement présent et l'abaissement de l'ion fragment en C<sub>23</sub> ( $m/z$  404) confirme la linéarité de la fin de la chaîne. Comme c'était le cas pour l'acide 9-19:1 (cf. Figure 2-25, page 88), les fragments de la chaîne aliphatique sont facilement déterminés, de la position C-4 à C-23. L'insaturation est localisée en position C-14/C-15 où l'ion fragment  $m/z$  278 est observé, au lieu de  $m/z$  280 pour l'AGS correspondant, une différence de 12 apparaissant entre des carbones 13 et 14.

### III-2-4- *Penicillium citreonigrum*

#### III-2-4-1- Composition en acides gras des triglycérides et des phospholipides

La composition en AGTG et en AGPL est présentée Tableau 2-12. Les AGTG représentent près de 70% des lipides totaux contre uniquement 6% pour les AGPL, faisant de cette souche un organisme très intéressant du point de vue d'un producteur oléagineux.

**Tableau 2-12 : Composition en acides gras des triglycérides et des phospholipides de *P. citreonigrum***

Acides gras		LCE	Triglycérides	Phospholipides
Tétradécanoïque	14:0	14,00	0,57	0,51
Pentadécadiénoïque	15:2	14,79	tr.	-
Pentadécanoïque	15:0	15,00	0,12	0,43
9-Hexadécénoïque	9-16:1	15,79	1,36	3,61
Hexadécanoïque	16:0	16,00	16,17	24,81
4-Méthylhexadécénoïque	4-Me-16:1	16,16	0,60	0,25
6,8-Hexadécénoïque	6,8-16:2	16,39	1,30	1,22
4-Méthyl-6,8-hexadécadiénoïque A	4-Me-6,8-16:2	16,53	0,76	0,75
isomère B		16,58	1,06	1,14
isomère C		16,97	16,44	6,90
Heptadécadiénoïque	cj-17:2	17,25	0,69	0,25
9,12-Octadécadiénoïque	9,12-18:2	17,66	12,64	43,18
9-Octadécénoïque	9-18:1	17,86	25,08	8,90
Octadécanoïque	18:0	18,00	13,90	4,49
Octadécadiénoïque	cj-18:2	18,11	1,07	0,44
Octadécadiénoïque	cj-18:2	18,18	0,63	0,11
Octadécadiénoïque	cj-18:2	18,40	0,11	0,49
Octadécadiénoïque	cj-18:2	18,50	0,28	-
Nonadécadiénoïque	19:2	18,84	0,33	-
Nonadécanoïque	19:0	19,00	tr.	-
Nonadécadiénoïque	cj-19:2	19,23	0,10	-
Octadécatriénoïque	cj-18:3	19,50	-	0,16
Octadécatriénoïque	cj-18:3	19,55	-	0,17
10,14-Eicosadiénoïque	11,14-20:2	19,66	0,43	0,20
10-Eicosadécénoïque	10-20:1	19,75	0,15	-
11-Eicosadécénoïque	11-20:1	19,80	0,42	0,18
Eicosanoïque	20:0	20,00	3,22	0,11
Heneicosanoïque	21:0	21,00	tr.	-
Docosadécénoïque	22:1	21,72	0,13	-
Docosanoïque	22:0	22,00	1,56	tr.
Tricosanoïque	23:0	23,00	tr.	-
2-Hydroxydocosanoïque	2-OH-22:0	23,23	-	0,33
Tétracosénoïque	24:1	23,73	tr.	-
Tétracosanoïque	24:0	24,00	0,90	0,16
2-Hydroxytétracosanoïque	2-OH-24:0	25,28	-	1,03

Trente-et-un AG ont été identifiés chez cette souche, comprenant de 14 à 24 carbones. Des similitudes et des disparités sont observées dans la composition en AGTG et AGPL. Chez les AG majoritaires (acides palmitique, oléique, linoléique et stéarique) des variations de leurs abondances

respectives dans les AGTG et les AGPL sont observées. Certains AG sont absents dans les PL comme les acides 15:2, 19:2, 19:0, 10-20:1, 21:0, 22:1 et 23:0. D'autres n'ont pas été identifiés dans les TG comme les acides 2-hydroxylés à 22 et 24 carbones.

Plusieurs AG sont retrouvés, en faibles proportions, aussi bien dans les TG que dans les PL comme les acides 14:0, 15:0, 9-16:1, 11,14-20:2, 11-20:1, 20:0, 22:0 et 24:0.

Plusieurs AGC à 18 carbones ont été identifiés dans les deux types de lipides : quatre isomères d'ALC dans les AGTG dont les trois premiers ont été également observés dans les AGPL. Par contre, deux isomères d'ALnC ont aussi été mis en évidence mais uniquement dans les PL.

Sept AG originaux ont été identifiés dans les TG et les PL, pas toujours dans les mêmes proportions. Six d'entre eux correspondent à des AGC et quatre à des AG ramifiés en position 4. Ils sont listés ci-dessous selon leur ordre d'éluion :

- l'acide 4-méthylhexadécénoïque (4-Me-16:1) élué juste après l'acide palmitique (LCE = 16,16)
- l'acide 6,8-hexadécadiénoïque (6,8-16:2) (LCE = 16,36)
- les trois isomères de l'acide 4-méthyl-6,8-hexadécadiénoïque (**A**, **B** et **C** présentant respectivement des LCE de 16,53, 16,58, et 16,97) dont le dernier (**C**) est présent à plus de 16% dans les TG.
- l'acide heptadécadiénoïque conjugué (cj-17:2) (LCE = 17,25)
- l'acide nonadécadiénoïque conjugué (cj-19:2) (LCE = 19,23)

Les pics d'éluion CPG de ces différents AG sont visibles Figure 2-27, excepté le dernier (cj-19:2).

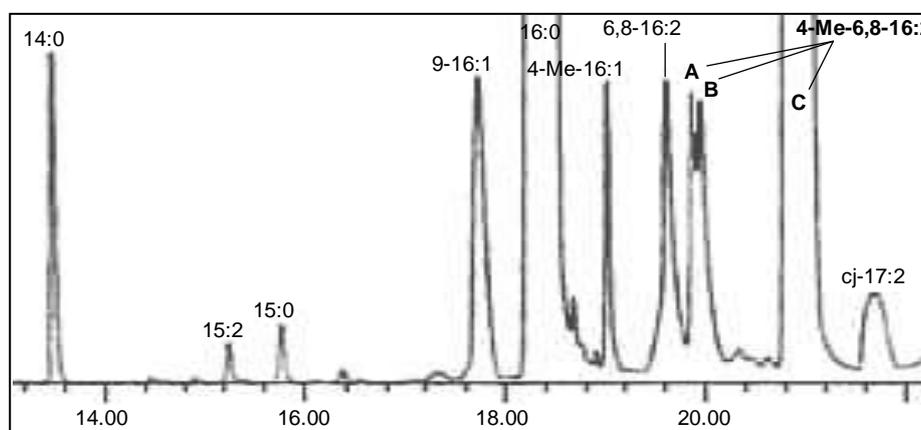


Figure 2-27 : Chromatogramme CPG/SM partiel des TG de *Penicillium citreonigrum*

Tous ces AG ont pu être analysés individuellement à partir de leur spectre de masse (EMAG et/ou NAP) et l'analyse de leur comportement chromatographique (LCE).

Les sept AG sont présentés en fonction de leur nombre croissant de carbones. Le premier correspond à l'acide hexadécadiénoïque conjugué (LCE = 16,39). Cet AG a été observé sous forme d'EM mais également sous forme de NAP. Les spectres respectifs sont présentés Figure 2-28 et Figure 2-29 page suivante.

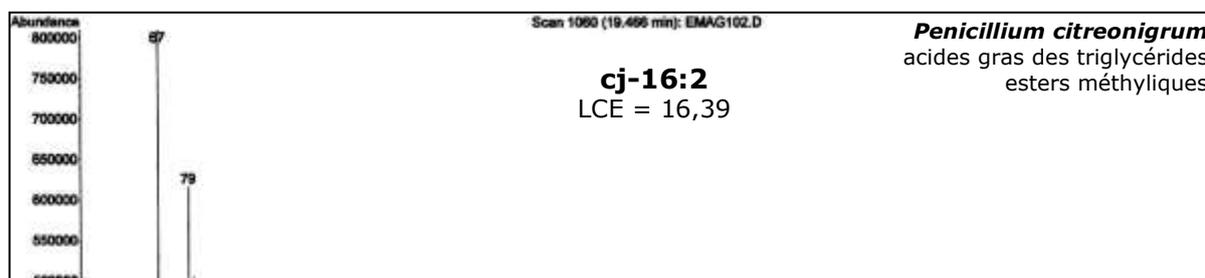


Figure 2-28 : Spectre de l'EM de l'acide hexadécadiénoïque conjugué

La présence d'un système conjugué chez cet AG est interprétée, d'une part, par son temps de rétention particulièrement anormal (LCE = 16,34) sur phase apolaire : il est élué après l'EM de son correspondant linéaire saturé.

D'autre part, l'abondance de l'ion moléculaire  $M^+$  est caractéristique des esters d'AGC.

L'ion moléculaire ( $m/z$  266) est accompagné des pics diagnostics  $[M-32]^+$ ,  $[M-74]^+$  et  $[M-116]^+$ , respectivement à  $m/z$  234 et 192 et 150 qui confirment qu'il s'agit d'un EMAG à 16 carbones diinsaturé. L'abaissement de l'ion  $m/z$  74 (Mac Lafferty) et de l'ion fragment parent  $m/z$  87 correspond bien à la présence d'insaturations. Le spectre de masse NAP correspondant à cet AG permet de déterminer la position des insaturations (Figure 2-29).

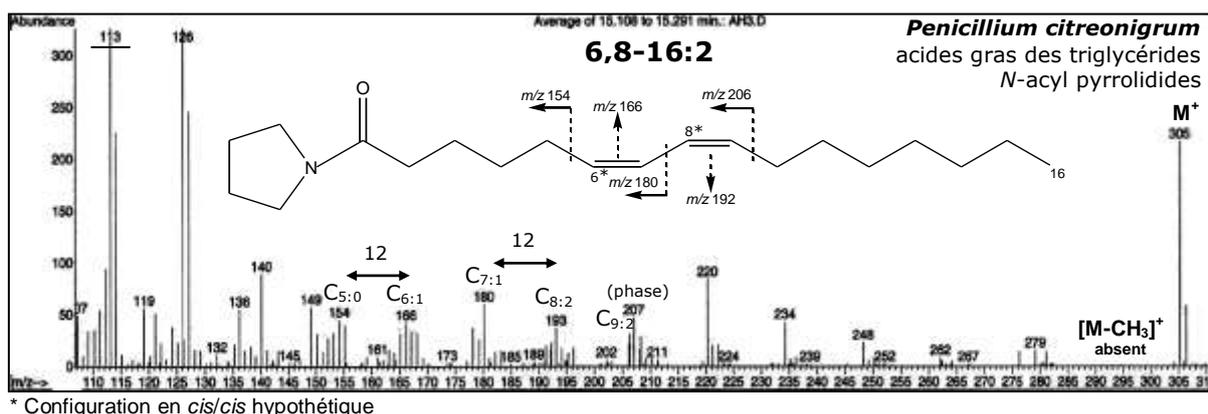


Figure 2-29 : Extrait du spectre de masse du dérivé NAP de l'acide hexadécadiénoïque

Il s'agit, ici, d'un agrandissement de spectre où l'ion  $m/z$  113 (Mac Lafferty) est le pic de base. L'ion moléculaire ( $m/z$  305) confirme qu'il s'agit d'un AG à 16 carbones présentant deux insaturations (337–4H). Cet NAP est, de plus, bien élué après celui de l'acide palmitique avec une LCE = 16,38. Il s'agit donc bien du même AG déjà observé sous forme d'EM. L'analyse des ions fragments permet de proposer les positions des doubles liaisons conjuguées entre C-6 et C-7 et C-8 et C-9 bien que de nombreux ions parasites soient présents, dus à une pression peut-être un peu forte dans la chambre d'ionisation et à la

présence d'un phtalate ( $m/z$  149, 167 et 279) et de fragments de dégradation de la phase siliconée ( $m/z$  207).

En observant les ions fragments produits, nous pouvons constater que :

- la chaîne est saturée de l'extrémité fonctionnelle jusqu'à la position C-4
- les insaturations sont comprises entre les positions C-5 et C-9
- la chaîne est saturée de la position C-10 à C-16
- le fragment en  $C_{15:2}$  ( $m/z$  290) est abaissé, ce qui permet de conclure que la fin de chaîne est linéaire.

Trois combinaisons de systèmes conjugués sont alors possibles :  $\Delta 5,7$ ,  $\Delta 6,8$  ou  $\Delta 7,9-16:2$ . La première combinaison implique la présence des ions  $m/z$  140-152 pour l'insaturation entre les positions C-5/C-6 et 166-178 pour celle entre les positions C-7/C-8. L'ion  $m/z$  152 est présent mais moins abondant que l'ion  $m/z$  154, il ne semble donc pas que la première double liaison intervienne en C-5/C-6. De plus, l'ion  $m/z$  178 est nettement plus faible que l'ion  $m/z$  180. Donc la seconde double liaison n'est pas localisée en C-7/C-8. En recherchant, de même, les ions diagnostics attendus pour les deux autres combinaisons possibles (6,8 et 7,9-16:2), il apparaît logique de proposer la première insaturation entre les positions C-6/C-7 avec une différence de 12 entre les ions  $m/z$  154 et 166 puis une deuxième insaturation entre les positions C-8/C-9 avec un intervalle de 12 entre les ions  $m/z$  180 et 192 (l'ion  $m/z$  193 observé peut-être produit par captation d'un proton).

Une série de quatre AG à 17 carbones, ramifiés en position 4, a pu être mise en évidence chez la souche *P. citreonigrum*, dont le plus important est présent à plus 16% dans les TG. La présence de la ramification a été déterminée à la fois à partir des spectres de leur EM et de leur NAP et confirmée par leur comportement chromatographique.

Débutons par le seul AGMI présent dans cette série, l'acide 4-méthylhexadécénoïque. Cet AG est élué juste après l'acide palmitique (LCE = 16,16) et donc avant l'acide 6,8-hexadécadiénoïque que nous venons d'analyser. Il n'a pu être réellement bien observé que dans le cas des EM (Figure 2-30, page suivante). En effet, à l'état NAP, les conditions de programmation linéaire de température au niveau de la colonne capillaire n'ont pas permis de le séparer suffisamment de l'acide palmitique. Sa présence a pu être détectée, sa ramification supposée mais le bruit de fond était trop important pour permettre la détermination de la position de son insaturation. Nous ne présenterons donc que le spectre de son EM.

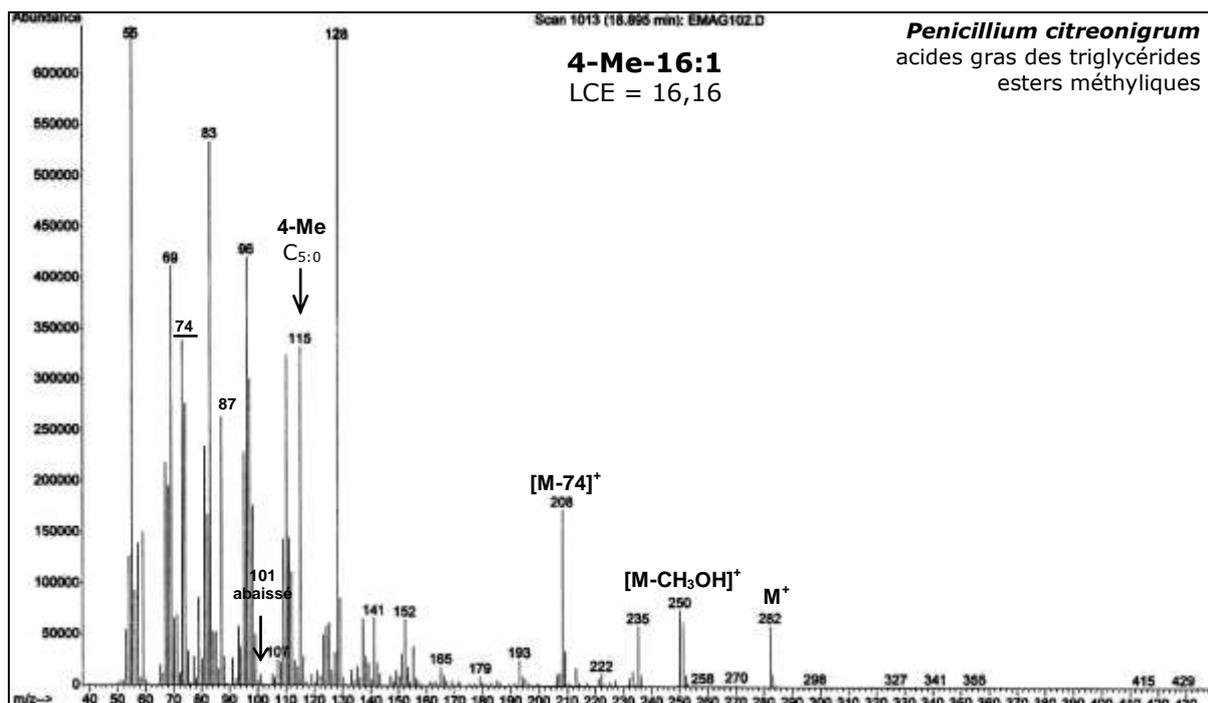


Figure 2-30 : Spectre de l'EM de l'acide 4-méthylhexadécénoïque

Plusieurs observations du spectre de l'EM de cet acide confirment que nous sommes en présence d'un AGMI à 17 carbones : l'ion moléculaire  $M^+$  observé à  $m/z$  282, accompagné des pics diagnostics  $[M-32]^+$  et  $[M-74]^+$  et l'abondance des ions  $m/z$  74 (Mac Lafferty) et  $m/z$  87 ( $C_{3:0}$ ).

Une ramification pour cet AG est soupçonnée, tout d'abord par rapport à son temps de rétention. En effet, cet AG est élué juste après l'acide palmitique alors qu'il devrait normalement présenter une LCE comprise entre 16,5 et 16,9 s'il était linéaire. Cette LCE plus faible ne peut être due qu'à la présence d'une ramification. De telles valeurs de LCE ont déjà été observés comme par exemple pour l'acide 9-Me-18:1 identifié dans les PL de l'éponge marine *Geodia* sp. qui présente une LCE de 18,06 (Veloasoetsy, 2005).

L'analyse du spectre de son EM permet de localiser la position de la ramification. En effet, il est intéressant d'observer l'ion fragment  $m/z$  115 (attendu pour  $C_{5:0}$ ) anormalement abondant accompagné de l'abaissement de l'ion  $m/z$  101. Cette observation est très intéressante car lorsque l'on compare ce spectre d'EM avec celui d'un AGMI linéaire, comme par exemple, celui de l'acide 9-17:1 (cf. Figure 2-9, page 62) on remarque que l'ion  $m/z$  115 est difficilement observable, alors qu'ici il est présent à plus de 50%. Cette prédominance de l'ion  $m/z$  115, accompagnée de l'abaissement de l'ion  $m/z$  101, permet de déduire la ramification en position 4. L'ion  $m/z$  141 suivant pourrait correspondre à l'ion fragment  $C_{7:1}$ .

De telles observations pour des esters d'AG ramifiés ont déjà été décrites. Ainsi, l'acide phytanique (3,7,11,15-Me<sub>4</sub>-16:0), isolé de l'éponge *Stylissa carteri* (Veloasoetsy *et al.*, 2004) montre, sous forme d'EM, quatre ions fragments à  $m/z$  101, 171, 241 et 311 caractéristiques respectivement des coupures après les fragments  $C_4$ ,  $C_9$ ,  $C_{14}$  et  $C_{19}$ , alors que les ions qui les précèdent (87, 156, 227 et 297) sont absents, traduisant la position des ramifications en C-4, C-7, C-11 et C-15 (Veloasoetsy, 2005). Ceci a également été observé pour des acides 3-méthyldécapentanoïque et 3-méthyltétradécanoïque, identifiés chez l'éponge marine *Geodia* sp. (Veloasoetsy, 2005). L'ion  $m/z$  101 correspondant au fragment  $C_4$  était très abondant alors que l'ion  $m/z$  87 ( $C_3$ ), normalement très significatif chez les esters d'AGS linéaires, était inexistant, traduisant ainsi la présence d'une ramification en position C-3.

Il est important de remarquer que le pic principal correspond à un ion inhabituel à  $m/z$  128 chez l'EM de l'acide 4-Me-17:1. Sa génération lors de l'impact électronique pourrait traduire la présence de l'insaturation en position C-5. En effet, l'ion attendu est à ce niveau normalement à  $m/z$  129.

Trois AGC ramifiés suivent l'acide 4-Me-16:1 dont celui présent majoritairement dans les TG (Tableau 2-12). Les spectres de leurs EM respectifs sont présentés Figure 2-31, page suivante.

Les spectres des trois EM montrent de grandes similitudes. L'ion moléculaire  $M^+$  observé à  $m/z$  280 est accompagné des pics diagnostics  $[M-32]^+$  et  $[M-74]^+$  pour les trois EM et les ions  $m/z$  74 et 87 sont minoritaires. Nous sommes bien en présence d'AG diinsaturés. Il est important de noter que l'ion moléculaire de l'isomère **C** est plus abondant que ceux des deux premiers (**A** et **B**). Deux autres ions sont également présents sur les trois spectres à  $m/z$  141 et 193 ( $M-87$ ). Ces ions ne sont, généralement, pas observés pour des EM d'acides diinsaturés comme par exemple celui de l'EM de l'acide linoléique présenté Figure 2-12. L'ion  $m/z$  141 pourrait correspondre au fragment  $C_{7,1}$  pour lequel est normalement attendu l'ion  $m/z$  143. Il pourrait traduire la présence de la première insaturation.

Comme c'était le cas pour l'acide 4-Me-16:1, la position de la ramification en position C-4 est déduite pour les trois AG par l'abondance de l'ion  $m/z$  115 et l'abaissement de l'ion  $m/z$  101.

Etant donné l'état des connaissances, il est possible de proposer que les doubles liaisons des trois acides 4-Me-16:2 sont conjuguées. En effet, bien que la position des insaturations ne soit pas déterminable à partir des spectres des EM, le système conjugué est déduit du temps de rétention observé pour ces trois acides sur phase apolaire. Nous savons, d'une part, que les acides ramifiés sont élués avant leurs correspondants linéaires et d'autant plus tôt qu'ils sont insaturés, comme nous l'avons observé pour l'acide 4-Me-16:1, élué très tôt, juste après l'EM de l'acide palmitique (LCE = 16,16).

D'autre part, nous avons montré que les AGC sont élués à la suite de leur correspondant saturé en phase apolaire. En tenant compte de ces caractéristiques d'élution et de la présence de ramification, les LCE observées pour les trois AG, c'est-à-dire 16,53 ; 16,58 et 16,97 respectivement, ne peuvent s'expliquer que par la présence d'un système conjugué. En effet, si ce n'était pas le cas, ces AG seraient élués avant l'acide 4-Me-16:1 et présenteraient donc des LCE inférieures à 16,16. La rétention sur la colonne capillaire apolaire s'explique donc par la présence d'insaturations conjuguées. Enfin, si on ne tient pas compte de la ramification et que l'on considère uniquement le système conjugué, les trois acides devraient présenter des LCE supérieures à 17,00. C'est d'ailleurs le cas pour le dernier 17:2 (LCE de 17,25).

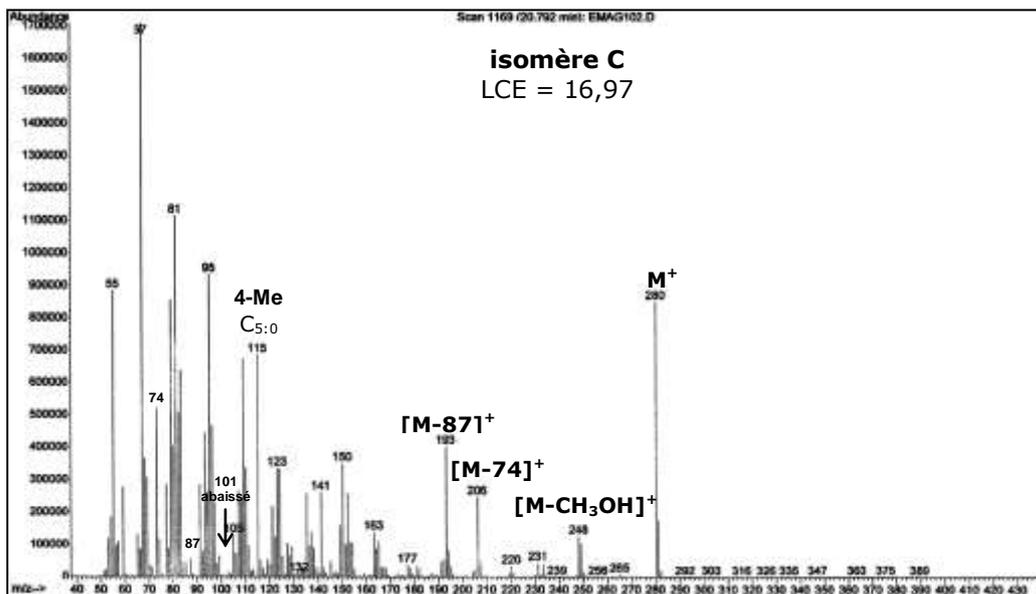
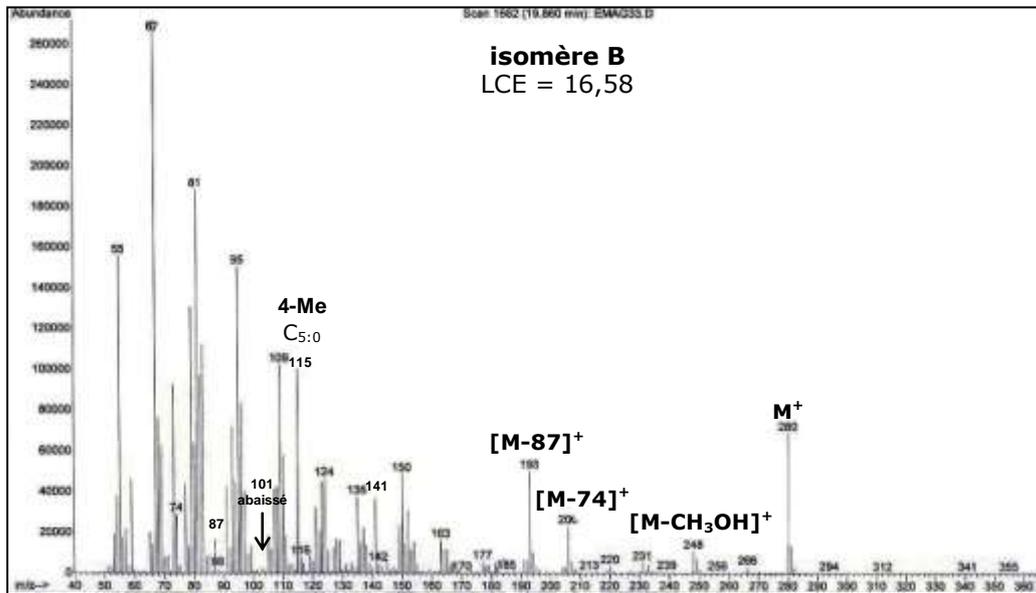
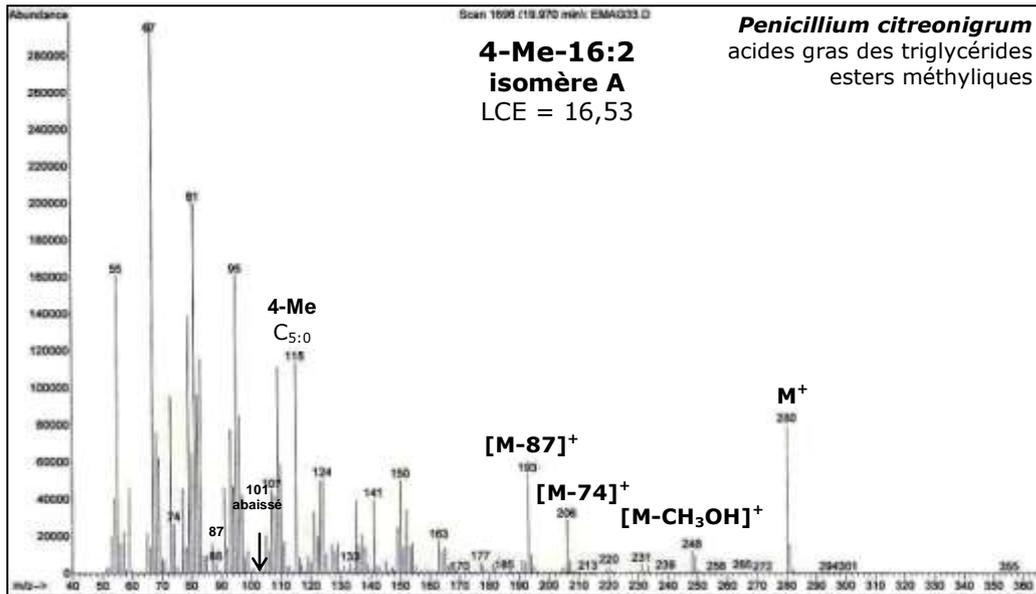
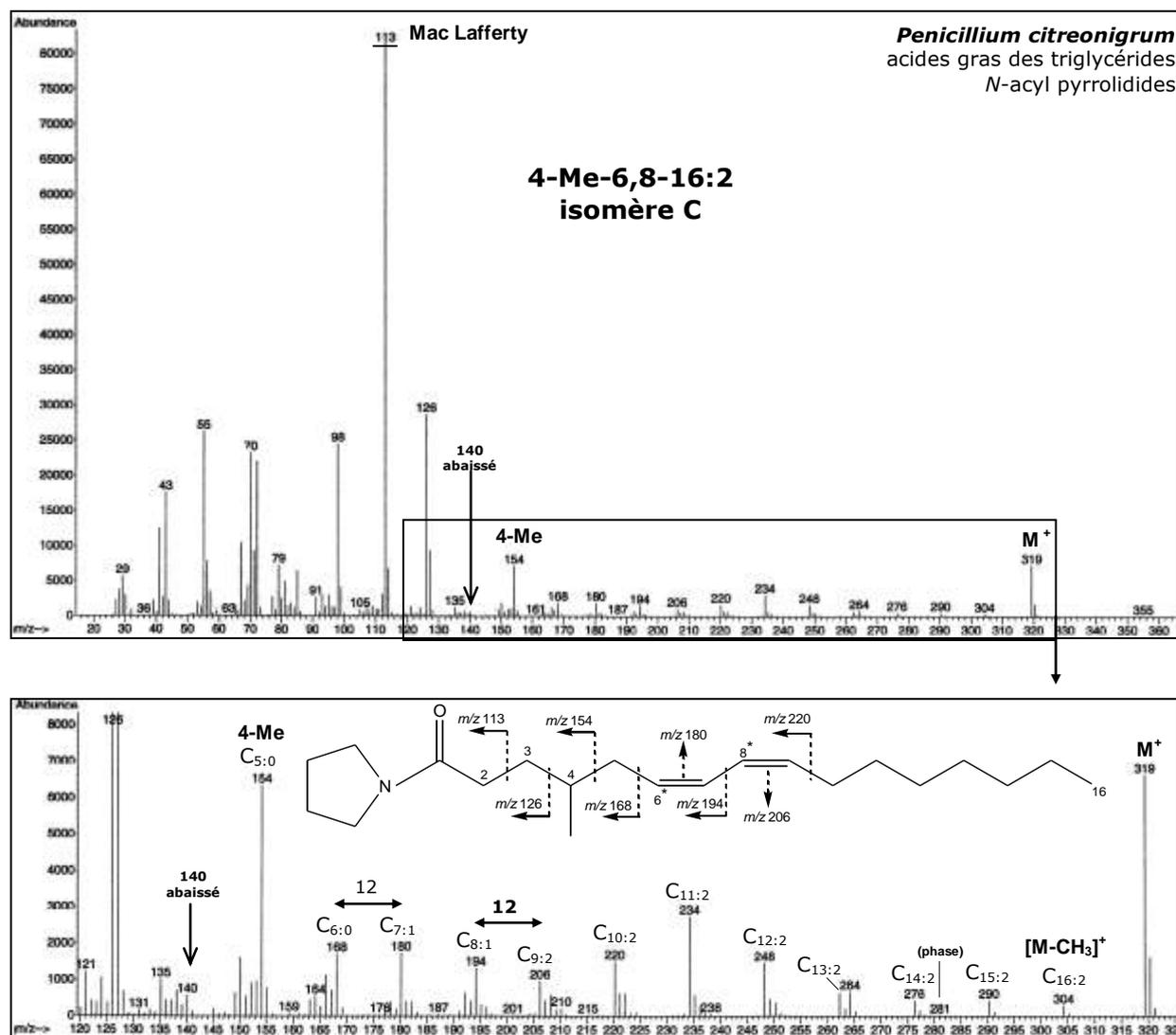


Figure 2-31 : Spectres des EM des isomères A, B et C de l'acide 4-Me-16:2

Après dérivation des EMAG en NAP d'acides gras, seulement deux des trois AG ont été détectés. Les deux NAP détectés présentent des LCE voisines à celles des EM, respectivement de 16,59 et 16,97. L'étude de leur spectre de masse nous a permis de déterminer la position des doubles liaisons et de confirmer les hypothèses postulées lors de l'analyse des spectres de leur EM : la présence d'une ramification en C-4 et la conjugaison des insaturations. Le spectre NAP du 4-Me-16:2 majoritaire est présenté Figure 2-32.



\* Configuration *cis/cis* hypothétique

Figure 2-32 : Spectre de masse du NAP de l'isomère C de l'acide 4-Me-6,8-16:2

Le spectre de masse montre bien qu'il s'agit d'un NAP avec les ions clés caractéristiques  $m/z$  113 (Mac Lafferty) et 126. L'ion moléculaire, facilement détectable à  $m/z$  319 confirme la présence, d'une part de deux insaturations et, d'autre part, qu'il s'agit d'un AG de 17 carbones. La ramification en position C-4 est déduite par l'absence de l'ion  $m/z$  140, correspondant au fragment  $C_{4:0}$  et par l'importance de l'ion  $m/z$  154 ( $C_{5:0}$ ), de la même manière que pour les EMAG.

Un AG antibiotique similaire, isolé d'une souche de *Sporothrix* (Ascomycète) présente également une ramification en position C-4 et une double insaturation en C-7 et C-11. Les mêmes observations sont proposées par les auteurs concernant la ramification, à savoir un abaissement de l'ion  $m/z$  140 au profit de l'ion  $m/z$  154 (Choudhury *et al.*, 1994).

La localisation des doubles liaisons est clairement repérable au niveau des ions  $m/z$  180 et 206 pour lesquels seraient normalement attendus les ions  $m/z$  182 (+ 2H) et  $m/z$  210 (+4H) si la chaîne était saturée. Une différence de 14 est notée entre les ions fragments  $C_1$  à  $C_5$ , et  $C_9$  à  $C_{16}$ , confirmant la saturation de ces deux parties de chaîne.

L'agrandissement du spectre confirme d'une part la méthylation en position C-4 : l'ion  $m/z$  140 est très minoritaire, la coupure s'opérant préférentiellement après la ramification, ce qui se traduit par l'importance de l'ion  $m/z$  154. Notons que cet ion, bien que considéré comme attendu chez les NAP est la plupart du temps de faible intensité pour les AG linéaires, comme c'est le cas pour l'ion  $m/z$  115 correspondant chez les EMAG. De plus, la conjugaison des doubles liaisons est également mieux observée après agrandissement de la zone, avec la présence des ions  $m/z$  180 et 206. Nous sommes donc en présence d'un AG constitué de 17 carbones, ramifié en position C-4, présentant deux insaturations conjuguées proches de la ramification entre C-6/C-7 et C-8/C-9.

Nous avons pu extraire également à partir des NAP des TG, l'un des deux autres AG ramifiés diinsaturés (LCE = 16,53). Son spectre NAP est présenté Figure 2-33.

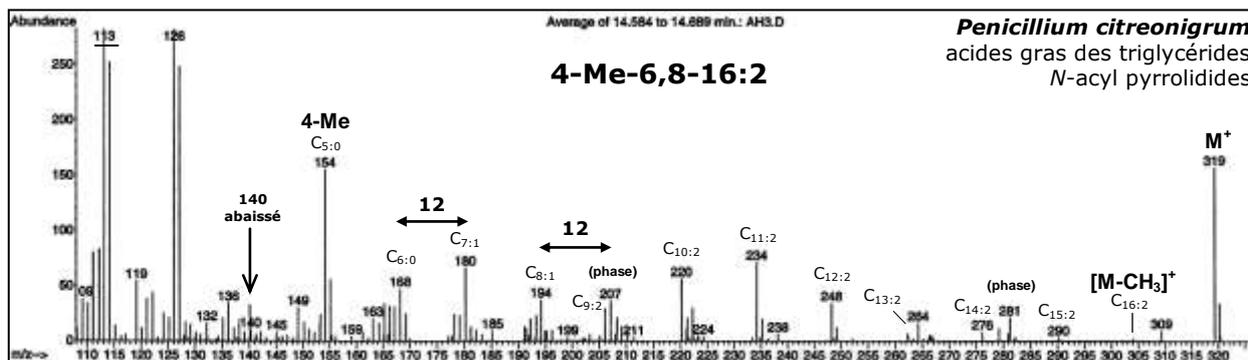
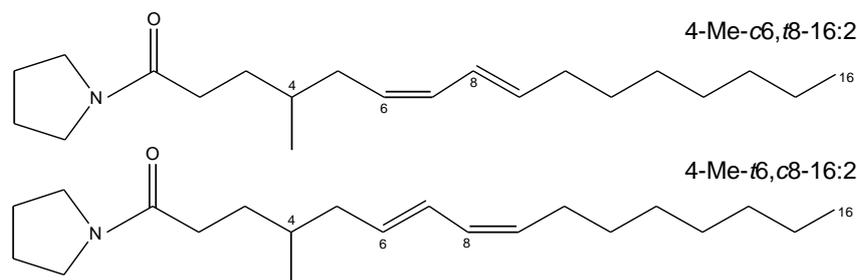


Figure 2-33 : Spectre du NAP de l'acide 4-Me-6,8-16:2 (LCE = 16,53)

Le spectre de masse montre un profil pratiquement identique au précédent : abaissement de l'ion  $m/z$  140 au profit de l'ion  $m/z$  154 mais surtout, les mêmes positions des insaturations, conjuguées, en position C-6 et C-8. A ce niveau d'analyse, nous pouvons dire que les trois acides correspondent à des isomères de configuration et non pas à des isomères de position. Il est possible d'émettre des hypothèses raisonnables quant à la configuration des insaturations en se basant sur les caractéristiques d'éluion des différents isomères d'ALC commerciaux (cf. Tableau 2-3, page 68). D'après leur ordre d'éluion, les acides  $c9,t11$  et  $t9,c11-18:2$  sont confondus dans le même pic d'éluion CPG (LCE = 18,11). De plus, l'acide  $c10,c12-18:2$  est élué beaucoup plus tardivement (LCE = 18,50) que l'acide  $t10,c12-18:2$  (LCE = 18,20).

Compte tenu, dans notre cas, qu'il s'agit uniquement d'isomères de configuration, les deux premiers acides (**A** et **B**), dont les EM présentent des LCE très proches (16,53 et 16,58), pourraient correspondre aux isomères de configuration *cis/trans* et *trans/cis* :



Le dernier (**C**), le plus important et plus tardivement élué (LCE = 16,97), pourrait correspondre à l'isomère de configuration tout *cis*.

Remarque : Nous avons pu confirmer la structure des acides conjugués 6,8-16:2 et 4-Me-6,8-16:2 en réitérant l'analyse CPG/SM de l'échantillon NAP correspondant (AGTG). Les spectres de masse obtenus ont confirmé d'une part, la présence de systèmes conjugués en position C-6/C-8 et d'autre part, la présence d'une ramification en C-4 pour les acides 4-méthylés. Il est important de remarquer que cette seconde analyse a été réalisée à plus d'une année d'intervalle, sur le même échantillon conservé à -18°C sans présence d'antioxydant et solubilisé dans du dichlorométhane. Les dérivés NAP n'ont donc pas été dégradés au cours de cette période.

Aux trois isomères de l'acide 4-Me-6,8-16:2 s'ajoute un quatrième AGC à 17 carbones, élué entre le dernier acide 4-Me-6,8-16:2 (majoritaire, LCE = 16,97) et l'acide linoléique (17,66). Le spectre de son EM est présenté Figure 2-34.

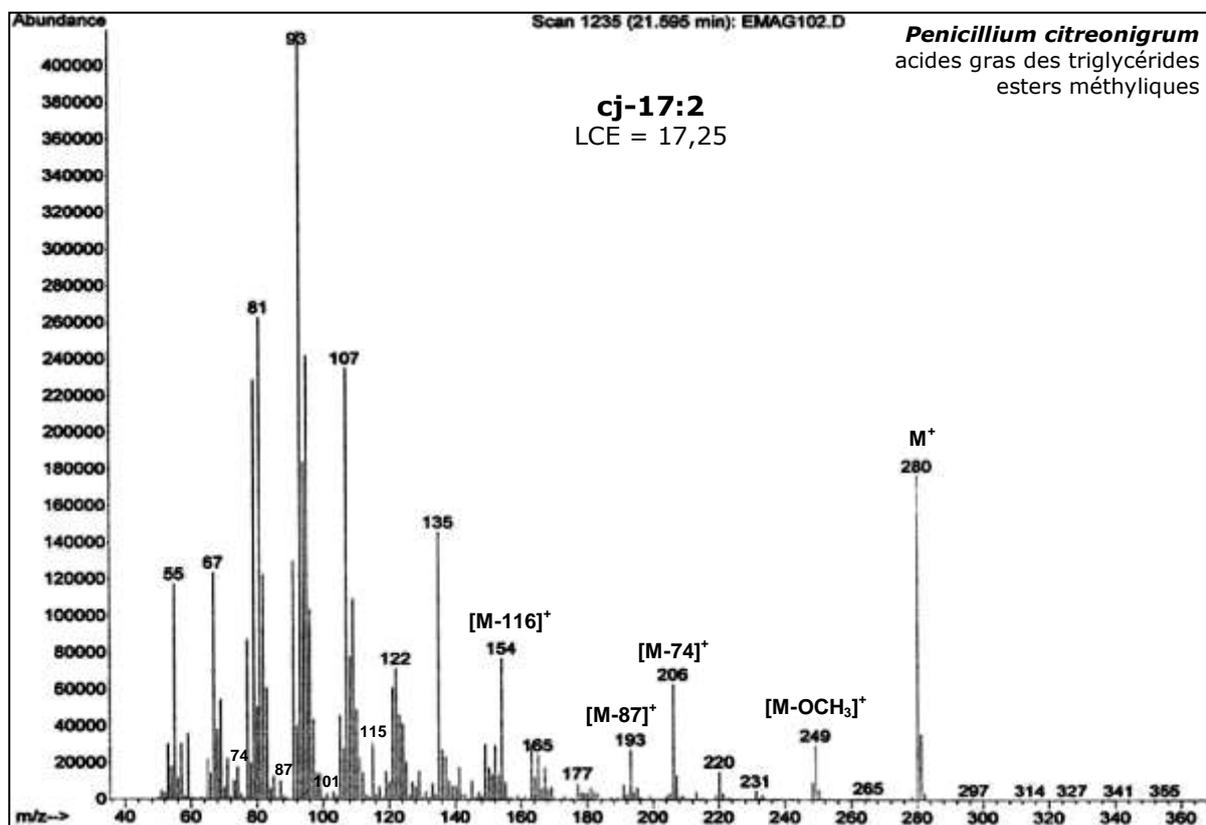


Figure 2-34 : Spectre de l'EM de l'acide heptadécadiénoïque conjugué

Nous pouvons considérer, du fait de la LCE de cet AG (17,25) qu'il s'agit d'un acide 17:2 conjugué. L'abondance de l'ion moléculaire  $M^+$  ( $m/z$  280) va également dans ce sens. Cet AG ne correspond pas à un AG ramifié en position C-4. En effet, contrairement aux trois 4-Me-6,8-16:2, l'ion  $m/z$  115 est faiblement abondant. Les pics diagnostics  $[M-31]^+$ ,  $[M-74]^+$ ,  $[M-87]^+$  et  $[M-116]^+$  sont observés, associés aux pics  $m/z$  74 et 87, très minoritaires. Cet AG a été observé également sous la forme de son dérivé NAP (spectre non montré). Il apparaît clairement que la position C-4 n'est pas méthylée. En effet, il n'y a pas de prédominance de l'ion  $m/z$  154 sur l'ion  $m/z$  140. L'analyse de son spectre NAP ne nous a pas permis de déterminer la position des liaisons conjuguées. Toutefois, l'analyse des ions fragments, nous permet de cerner la position du système conjugué entre les carbones 5 à 9, les autres parties présentant des ions fragments distants de 14. Les systèmes conjugués C-6/C-8 ou C-7/C-9 sont tout à fait possibles dans ce cas.

Le dernier AGC détecté chez cette souche concerne un acide nonadécadiénoïque. Cet AGC présente une LCE de 19,23 (Figure 2-35).

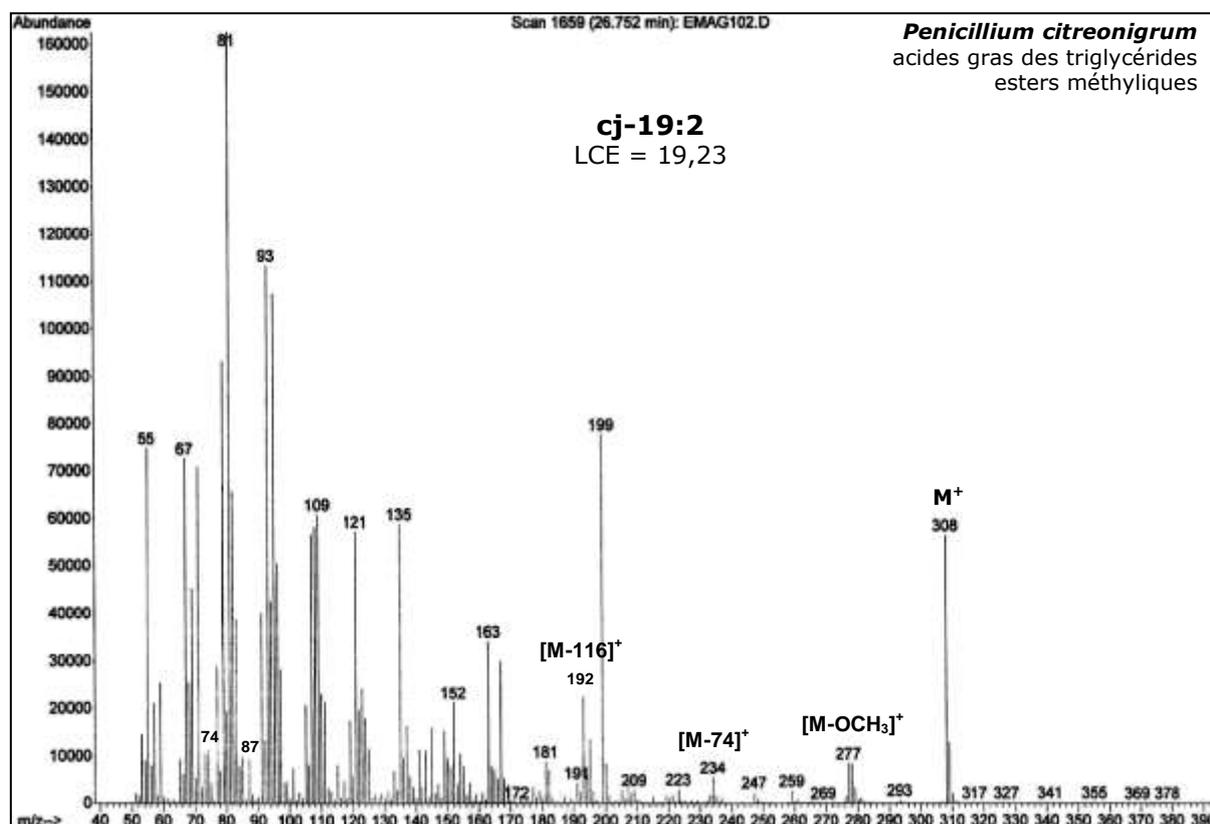


Figure 2-35 : Spectre de l'EM de l'acide nonadécadiénoïque conjugué

Comme pour les acides précédents, nous considérons que cet AG présente un système conjugué du fait de sa mobilité chromatographique. Le spectre de son EM montre un ion moléculaire  $M^+$  qui apparaît clairement à  $m/z$  308 (37%) accompagné des pics diagnostics  $[M-31]^+$ ,  $[M-74]^+$  et  $[M-116]^+$ . Le pic de base ( $m/z$  74, Mac Lafferty) et l'ion fragment  $C_3$  ( $m/z$  87) sont très minoritaires. Il est par contre difficile d'interpréter l'ion  $m/z$  199. Il pourrait s'agir du fragment  $C_{11:0}$  mais ce type de fragment est spécifiquement observé chez les EM saturés. Cet acide 19:2 conjugué a également été observé sous forme de NAP. Les ions fragments  $m/z$  140, 154, 169 (168+H?), 182, 196, 208, 221 (222-H?), 234, 248 et 262 sont observés. Il est possible de suggérer un système conjugué en position C-9/C-11, en considérant qu'il y a eu perte d'un proton pour l'ion  $m/z$  221 (au lieu de 222).



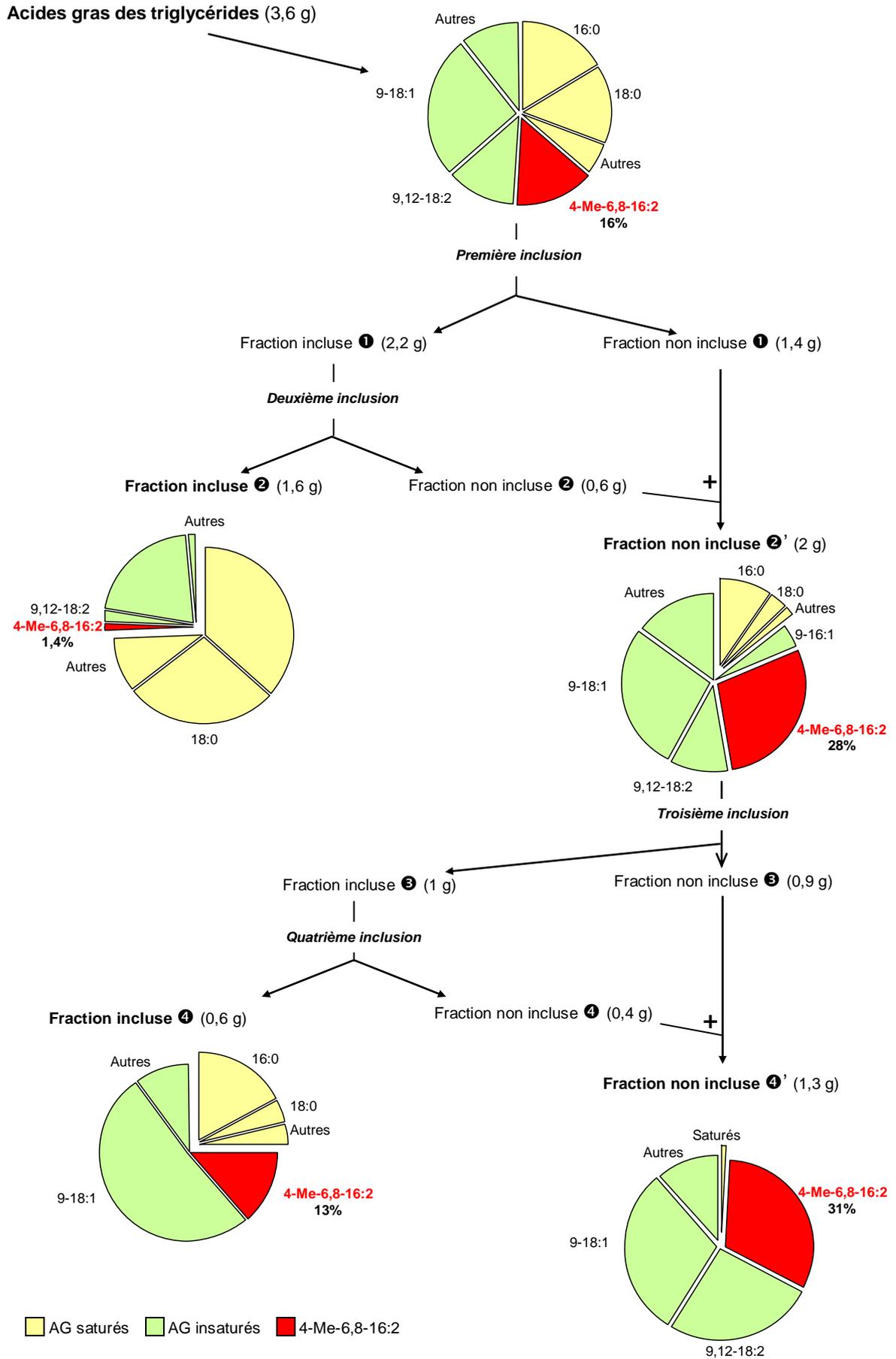


Figure 2-37 : Etapes successives d'inclusion dans l'urée permettant d'enrichir la fraction non incluse en acide 4-Me-6,8-16:2

Lors de la première inclusion, la **fraction incluse ①** obtenue était plus importante que celle **non incluse ②** (2,2 g contre 1,4 g). Or, au niveau des TG, la proportion des AGS ne représente que 36% de la totalité des AGTG contre 64% pour les AGI. Il est ainsi fort probable que des AGI aient été piégés dans la fraction complexée à l'urée.

Pour cela, une deuxième inclusion a été entreprise sur la **fraction incluse ①** pour exclure les AGI. Cette deuxième inclusion a permis d'appauvrir la **fraction incluse ②** (1,6 g) et une petite **fraction non incluse ③** a été obtenue (0,6 g). Cette dernière a été ajoutée à la première **fraction non incluse ①** pour donner une **fraction non incluse ②'** (2 g).

Les **fractions incluse ②** et **non incluse ②'** ont été analysées en CPG/SM après dérivation en EM. Les résultats obtenus sont ceux attendus, à savoir :

- Une **fraction incluse ②** très pauvre en AGPI, constituée, aux trois quarts, par les AGS, dont les majoritaires sont l'acide palmitique (36%) et l'acide stéarique (28%). Les autres AGS (14:0, 15:0, 20:0, 22:0 et 24:0) représentent 10% de la fraction. A noter qu'une proportion non négligeable de l'acide oléique a également été incluse à ce niveau (20%). Les 6% restants regroupent entre autre l'acide linoléique (3%) et l'acide 4-Me-6,8-16:2 (1,4 %). Ce dernier a été très faiblement inclus ce qui est un résultat positif. Cette fraction n'a donc plus été utilisée par la suite.
- Une **fraction non incluse ②'** constituée majoritairement d'AGI dont le 4-Me-6,8-16:2, enrichi à 28%, l'acide oléique (27%), l'acide linoléique (11%) et l'acide palmitoléique (4%). Les autres AGI présents, 15:2, 4-Me-16:1, 6,8-16:2, 4-Me-6,8-16:2, cj-17:2 ; cj-18:2, 19:2, 20:2, 20:1 et 22:1, sont minoritaires et représentent, au total, 15% de cette fraction. 14% d'AGS n'ont pas été inclus dans l'urée et se retrouvent donc dans cette fraction. Il s'agit principalement des acides palmitique (9%) et stéarique (3%) alors que les acides 14:0, 15:0, 20:0, 22:0 et 24:0 sont très faiblement présents (2%).

Nous avons donc choisi de réitérer une inclusion dans l'urée pour appauvrir cette fraction en acides palmitique et stéarique (troisième inclusion). Comme c'était le cas pour la première inclusion, la **fraction incluse ③** obtenue possédait une masse trop importante pour correspondre uniquement aux AGS, en comparaison avec la **fraction non incluse ②'**, dont elle est issue, et celle nouvellement obtenue (**fraction non incluse ③**).

Pour cela, une dernière inclusion a été réalisée sur la **fraction incluse ③** afin d'exclure les AG insaturés qui auraient pu être piégés. Les résultats obtenus sont acceptables. Le courant ionique total de la **fraction non incluse ④'** est présenté Figure 2-38, page suivante.

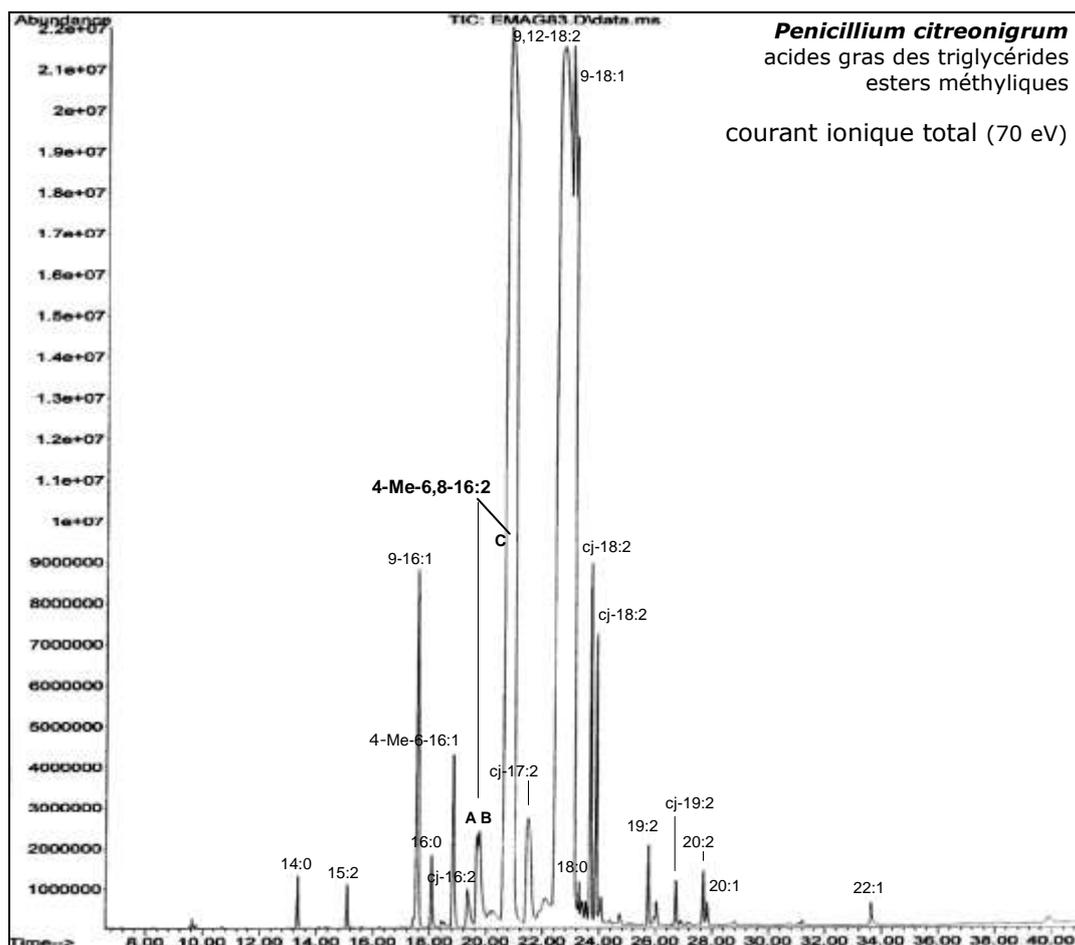


Figure 2-38 : Courant ionique total des EMAG présents dans la fraction non incluse ④'

La fraction **non incluse ④'** finale est pratiquement exempte d'AGS (1%), par contre la proportion de l'acide 4-Me-6,8-16:2 n'a augmenté que de 3% par rapport à la **fraction non incluse ③'**. Les deux autres AG majoritaires correspondent aux acides oléique (30%) et linoléique (26%). Sont également présents les acides 15:2, 4-Me-16:1, 6,8-16:2, 4-Me-6,8-16:2, cj-17:2, cj-18:2, 19:2, 20:2, 20:1 et 22:1, pour un total de 12%.

Une partie du 4-Me-6,8-16:2 est restée piégée dans la **fraction incluse ④**, correspondant à un total de 13%. L'AG majoritaire correspond à l'acide oléique (50%), accompagné des acides palmitique (17%) et stéarique (4,3%). Les AGI minoritaires (10%) correspondent aux acides 4-Me-16:1, cj-17:2 et 20:2.

Globalement, nous pouvons dire que cette série d'inclusions a été efficace. En effet, elle nous permis d'obtenir une fraction d'AGI relativement simplifiée par rapport au départ avec un enrichissement en acide 4-Me-6,8-16:2 qui a pratiquement doublé (de 16 à 31%). La perte de ce dernier dans la **fraction incluse ④** correspond à 78 mg, ce qui est assez faible par rapport aux 400 mg concentrés dans la **fraction non incluse ④'**.

Ainsi, 478 mg d'acide 4-Me-6,8-16:2 ont été obtenus à l'issue de ces étapes successives d'inclusion à l'urée pour une masse initiale, d'après sa proportion dans les TG, est évaluée à 580 mg. Ce rendement de 82% (masse finale/masse initiale) peut s'expliquer par une perte de produit lors des étapes de filtration et d'extraction hexanique au cours des étapes successives d'inclusion/exclusion par l'urée.

### III-2-4-1-2- Purification de l'acide 4-Me-6,8-16:2 par CLHP- $Ag^+$

L'inclusion à l'urée nous a permis d'obtenir un mélange d'AG moins complexe qu'au départ, appauvri en AGS et enrichi en acide 4-Me-6,8-16:2. La séparation des AG en CLHP nécessite souvent la dérivation en EM pour permettre une meilleure séparation. Pour cela, les AGI issus de l'étape d'inclusion dans l'urée ont été estérifiés avant injection.

Pour cette étape, qui consiste à purifier l'acide 4-Me-6,8-16:2 (EM) à partir de la **fraction non incluse ④'**, nous nous sommes basés sur une étude relative à la séparation et l'identification d'AGC par CLHP (Juanéda et Sébédio, 1999). Nous avons utilisé une colonne analytique polaire adaptée pour la séparation des lipides comme les TG et les AG, composée d'un gel de silice imprégné au nitrate d'argent, qui permet de séparer les AG selon leur degré d'insaturation.

Une phase mobile hexane/acétonitrile (99,85:0,15 ; v/v) en régime isocratique a été utilisée à un débit de 1 mL/min. La détection a été réalisée dans l'ultraviolet à une longueur d'onde de 215 nm. Les AG contenant des doubles liaisons conjuguées vont présenter à cette longueur d'onde des absorbances plus importantes que leurs analogues non conjugués et donc être plus facilement identifiables. Le chromatogramme obtenu est présenté Figure 2-39.

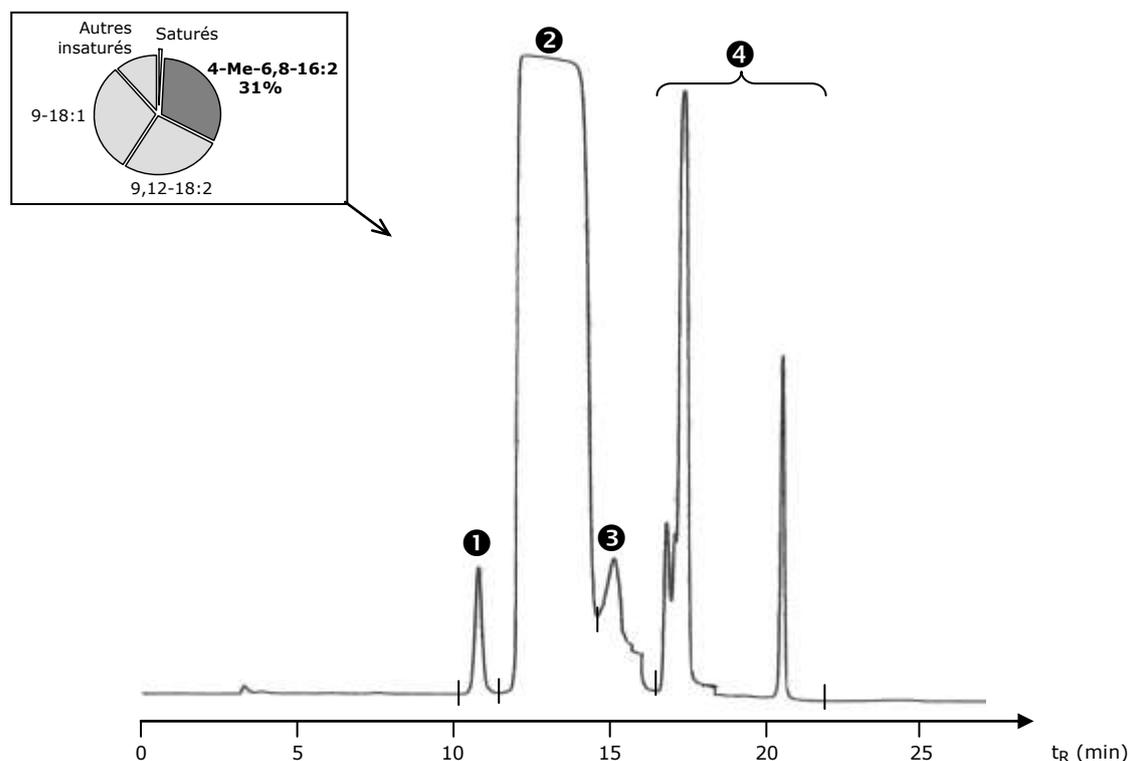


Figure 2-39 : Chromatogramme CLHP des EMAG de la fraction non incluse ④'

Quatre fractions ont été collectées entre 10 et 22 minutes. Les plus importantes correspondent aux fractions CLHP ② (44%) et ④ (56%). Les différentes fractions ont été analysées en CPG/SM pour contrôler l'efficacité de la séparation.

Les résultats obtenus sont très satisfaisants. La fraction CLHP ② qui montre en UV un pic asymétrique très large avec un plateau, concentre l'isomère C de l'acide 4-Me-6,8-16:2 à 92% comme le montre l'extrait du courant ionique total (Figure 2-40, page suivante).

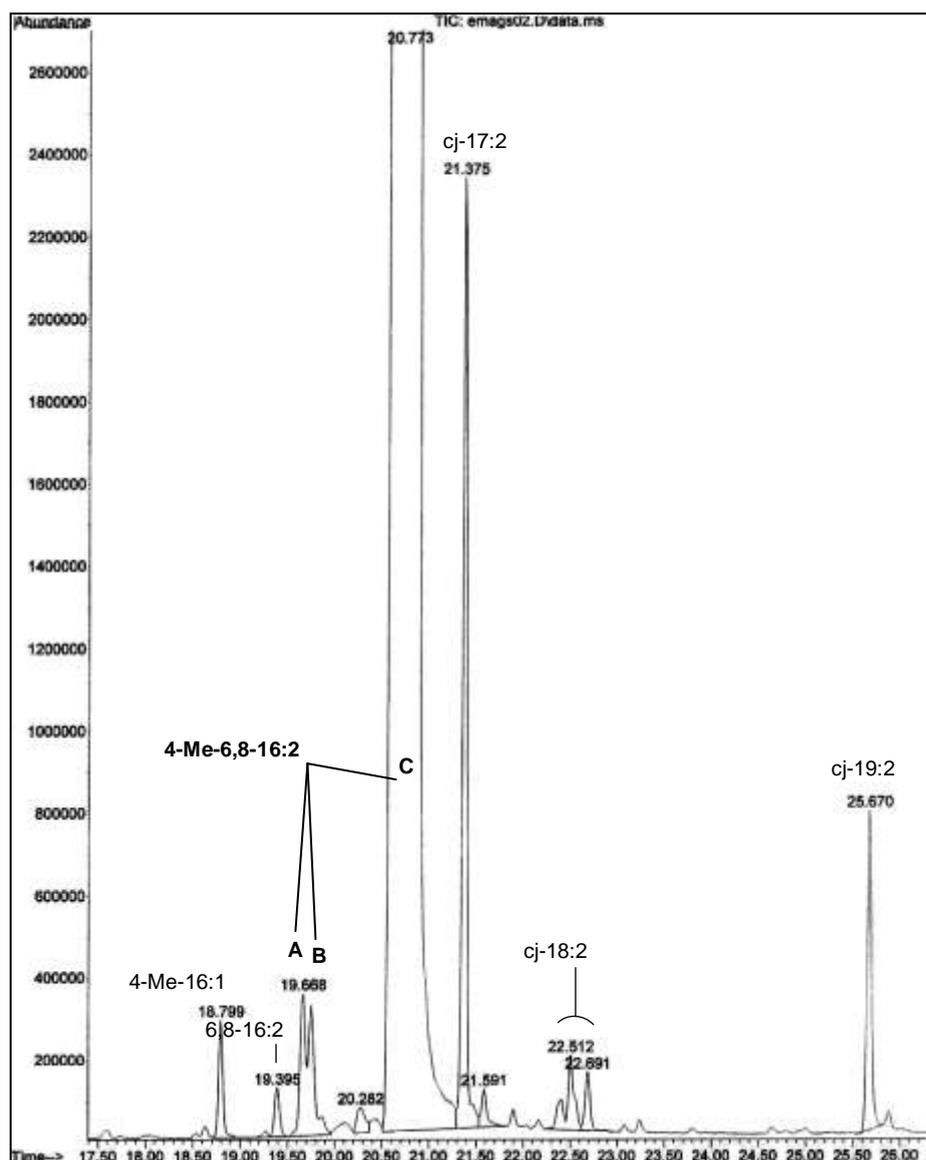


Figure 2-40 : Extrait du courant ionique total CPG de la fraction CLHP 3

L'acide 4-Me-6,8-16:2 est accompagné de l'AGC 17:2 (LCE = 17,25) à 5,6%. D'autres AG sont présents dans des proportions inférieures à 1%. Il s'agit des acides 4-Me-16:1 (LCE = 16,16), 6,8-16:2, des isomères, minoritaires, A et B de l'acide 4-Me-6,8-16:2 (LCE = 16,53 et 16,58), cj-18:2 (LCE = 18,11 et 18,20) et cj-19:2 (LCE = 19,23).

La fraction CLHP 1 présente majoritairement les AG insaturés 15:2, 4-Me-16:1 et 17:2. La fraction CLHP 3, très proche de la fraction CLHP 2, contient encore du 4-Me-6,8-16:2 (LCE = 16,97) mais c'est surtout l'acide cj-17:2 (LCE = 17,24) qui prédomine, inversement à la fraction CLHP 2. Enfin la fraction CLHP 4 présente majoritairement les acides oléique et linoléique.

Compte tenu des résultats de la séparation, une série d'injections a été réalisée dans les mêmes conditions afin d'obtenir des quantités suffisamment importantes d'acide 4-Me-6,8-16:2 pour poursuivre son étude. Vingt-neuf injections de la **fraction non incluse 1'** (46 mg) ont été réalisées permettant d'obtenir 13 mg de la fraction CLHP 2, soit 28% de la fraction de départ. La qualité de la séparation a été contrôlée par analyse CPG/SM (Figure 2-41, page suivante).

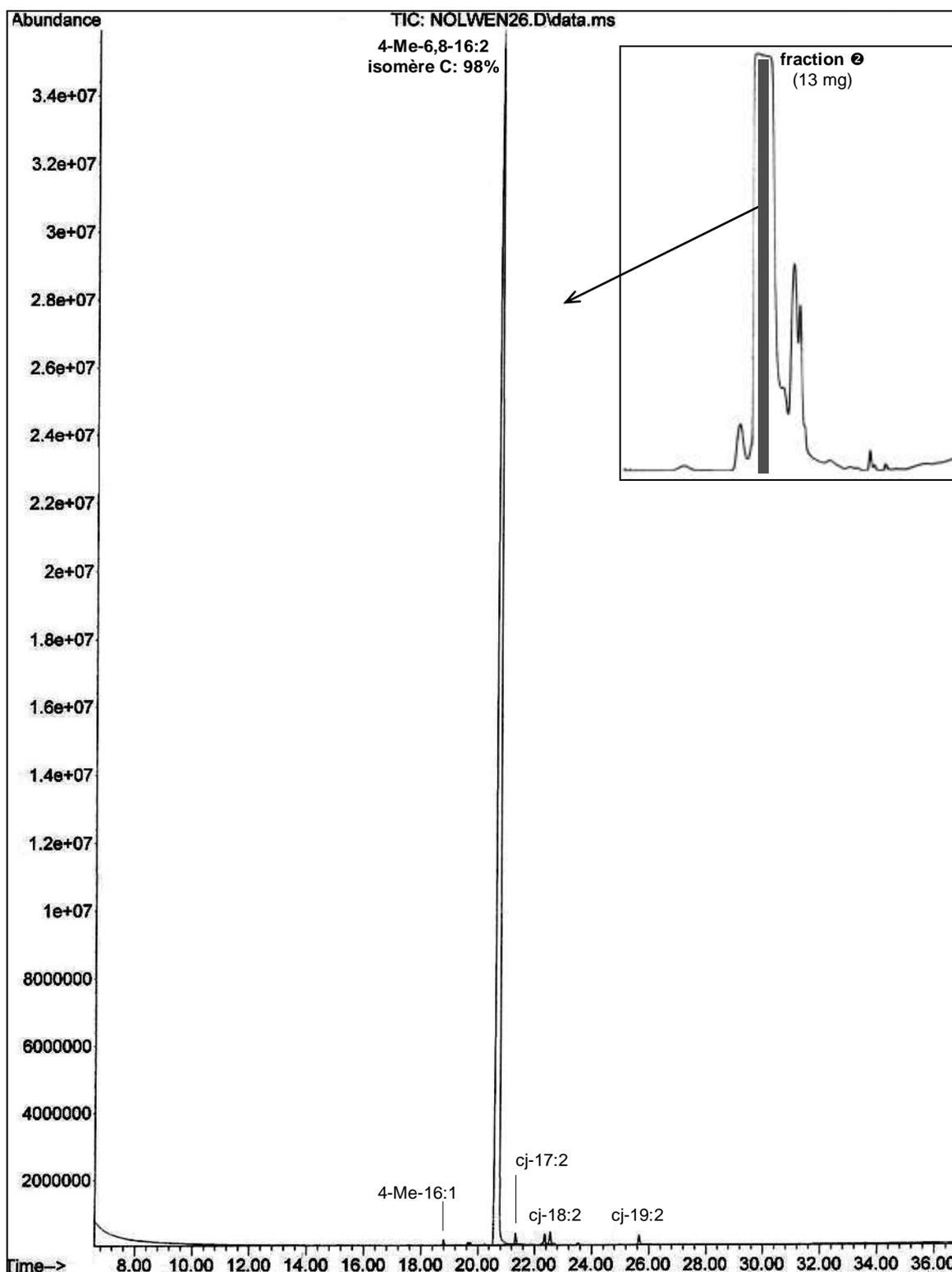


Figure 2-41 : Contrôle par CPG/SM de la pureté de la fraction CLHP 2

Cette opération a été couronnée de succès car l'isomère **C** de l'acide 4-Me-6,8-16:2 a été purifié à 98%, soit 6% de mieux que lors de la première série d'analyses CLHP. Les 2% restants concernent les deux autres isomères **A** et **B** de l'acide 4-Me-6,8-16:2 (LCE = 16,53 et 16,57) présents à 0,09 et 0,10% respectivement, l'acide 4-Me-16:1 (LCE = 16,16 ; 0,17%), l'acide cj-17:2 (LCE = 17,24 ; 0,38%) les acides cj-18:2 (LCE = 18,11 et 18,18 ; 0,42 et 0,46% respectivement) et l'acide cj-19:2 (LCE = 19,23 ; 0,35%).

### III-2-4-2- Actions sur la viabilité cellulaire

#### III-2-4-2-1- Test de cytotoxicité sur cellules KB

La fraction CLHP **2**, issue des étapes de CLHP sur colonne de gel de silice imprégné au nitrate d'argent a été testée sur lignée cellulaire cancéreuse KB. Une faible cytotoxicité a été observée, avec une  $Cl_{50}$  de  $46,08 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$  soit  $153,3 \pm 0,33 \mu\text{mol/L}$  (si l'on arrondit à une masse molaire de 300 g/mol).

#### III-2-4-2-2- Test de cytotoxicité sur cellules KMS 11 (myélome) et GBM (gliome)

Aucune action sur la viabilité cellulaire n'a été constatée pour les cellules KMS 11 et GBM (Figure 2-42).

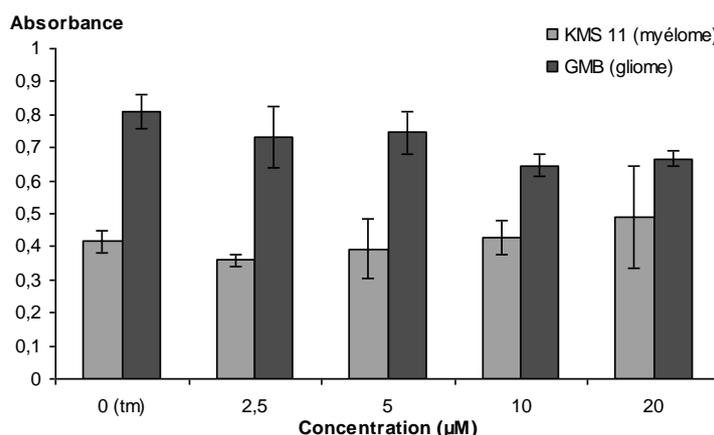


Figure 2-42 : Cytotoxicité de l'acide 4-Me-6,8-16:2 après 24h de traitement sur myélome et gliome

En effet, les valeurs d'absorbance lues après 24h de traitement en présence de l'EM de l'acide 4-Me-6,8-16:2 aux concentrations de 2,5, 5, 10 et 20  $\mu\text{M}$  se sont avérées très proches de celle du témoin (tm) pour les deux lignées étudiées.

#### III-2-4-2-3- Tests de cytotoxicité sur adénocarcinome du colon (cellules LS174T)

De la même manière que les tests de cytotoxicité précédents, l'EM de l'acide 4-Me-6,8-16:2 se montre inactifs sur adénocarcinomes du colon (Figure 2-43).

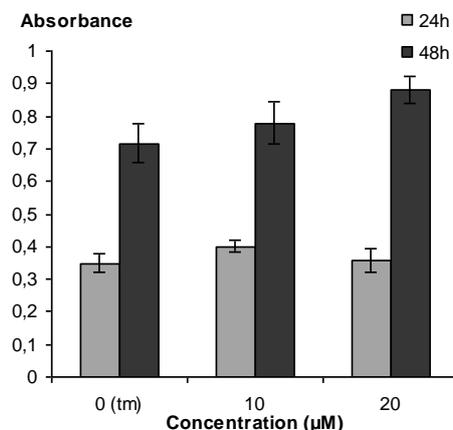


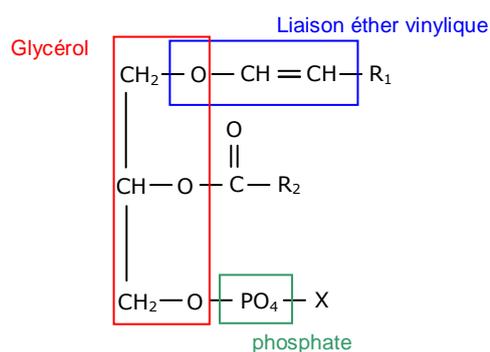
Figure 2-43 : Cytotoxicité de l'acide 4-Me-6,8-16:2 après 24 et 48 h sur adénocarcinomes du colon

Les lectures réalisées à 24h et 48h de traitement montrent une viabilité cellulaire pour les puits contenant l'EM de l'acide 4-Me-6,8-16:2 à des concentrations de 10 et 20  $\mu\text{M}$  très proches de la normale par comparaison avec les puits témoins.

### III-2-4-3- Mise en évidence de la présence de plasmalogènes

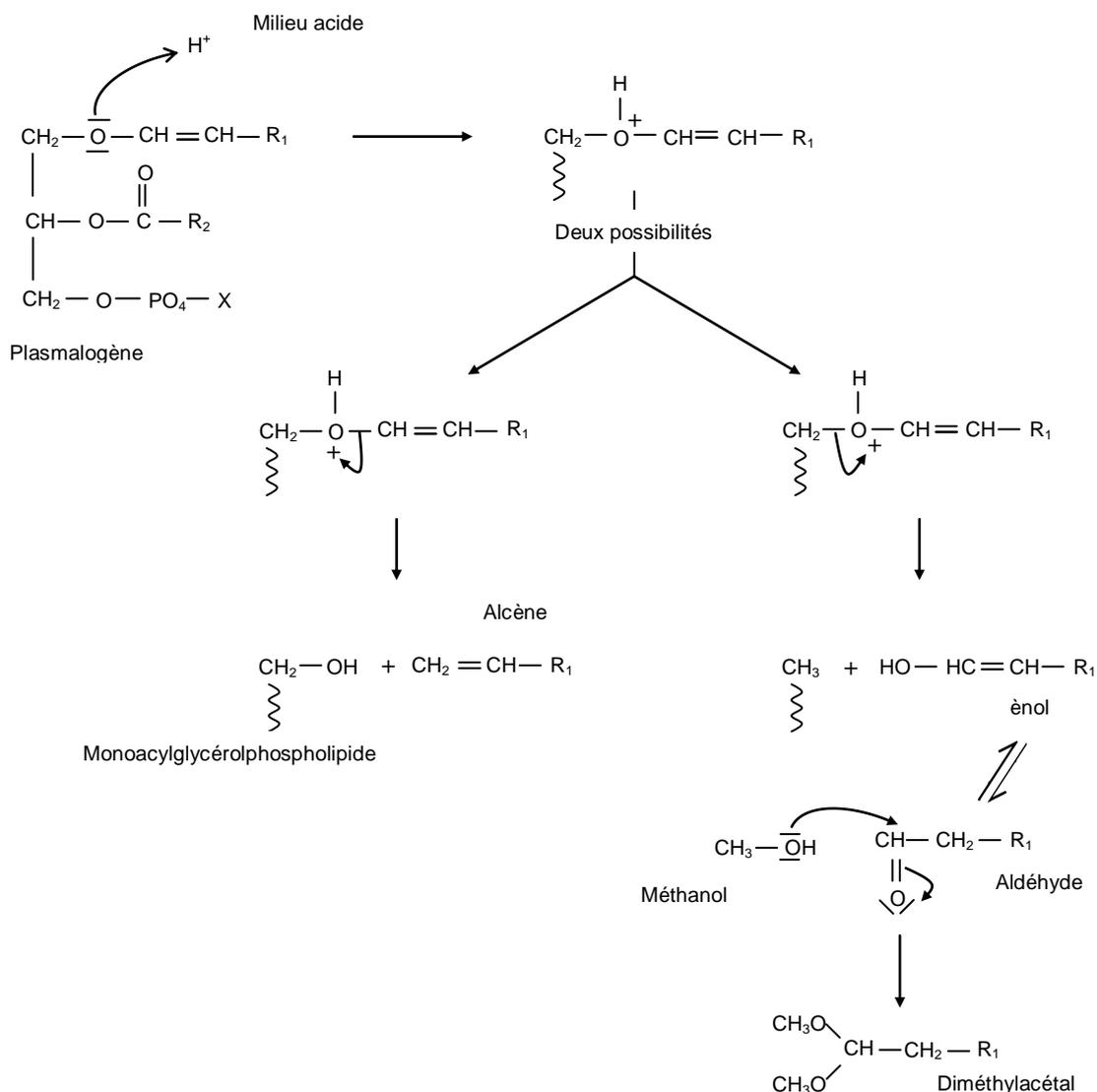
Les plasmalogènes, correspondent à une classe particulière de PL. Ils ont été mis en évidence par l'identification de diméthylacétals (DMA), lors de l'analyse des EMAG des fractions PL par CPG/SM.

Contrairement aux PL, dont les chaînes acyles sont estérifiées au squelette du glycérol en position *sn*-1 et *sn*-2, les plasmalogènes, eux, ont la particularité de présenter en position *sn*-1 une chaîne alkyle liée au glycérol par une liaison éther. Ces PL particuliers sont également caractérisés par la présence d'une insaturation, adjacente à la liaison éther. On parle alors de liaison éther vinylique (Figure 2-44).



**Figure 2-44 : Structure générale d'un plasmalogène**

Ainsi, tout glycérophospholipide présentant une liaison éther vinylique en position *sn*-1 est considéré comme appartenant à la classe des plasmalogènes. Cette liaison est responsable de la sensibilité spécifique des plasmalogènes aux acides et aux espèces oxygénées réactives. En milieu acide, les liaisons éther vinylique s'ouvrent rapidement pour former des aldéhydes, lesquels, en présence de méthanol, sont aussitôt convertis en DMA (Figure 2-45, page suivante).



**Figure 2-45 : Formation des diméthylacétals à partir des plasmalogènes**

En milieu acide (HCl), l'oxygène de l'éther capte un proton, il se forme un cation instable qui va se scinder en deux, selon deux possibilités, des deux côtés de l'oxygène. La première ouverture correspond à la formation d'un monoacylglycérolphospholipide et d'un alcène, la seconde, va engendrer un énol. Ce dernier se trouve en équilibre avec son aldéhyde correspondant, qui réagit avec le méthanol pour donner un DMA.

Ce type de mécanisme intervient lors des étapes de transestérification des PL où les conditions sont réunies pour permettre la formation de DMA. Ainsi, si l'échantillon étudié contient des plasmalogènes, la présence de méthanol chlorhydrique va permettre la formation de DMA. Les DMA se distinguent des EM, en CPG/SM, par la formation, lors de l'impact électronique, d'un carbocation  $[\text{CH}(\text{OCH}_3)_2]^+$  à  $m/z$  75 qui est stabilisé par résonance (Frankel *et al.*, 1984). Il s'agit du pic de base caractéristique des DMA (Figure 2-46, page suivante).

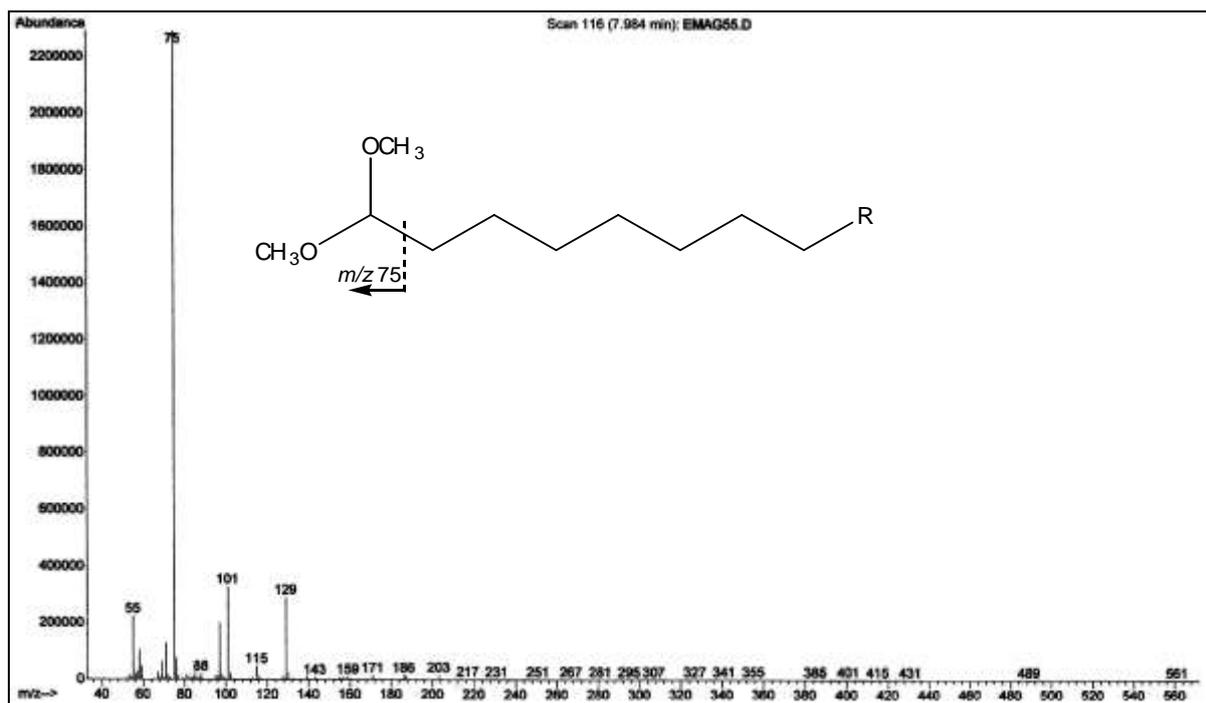


Figure 2-46 : Spectre de masse d'un diméthylacétal observé dans les EMAG de phospholipides (*T. longibrachiatum*)

Des DMA ont été détectés dans le courant ionique total des esters d'AGPL chez les deux souches de *Trichoderma*. A partir des cultures liquides de *T. longibrachiatum*, six DMA ont été détectés dans les échantillons d'AGPL.

Il est difficile d'identifier les DMA d'après leur spectre de masse obtenu en première analyse. Généralement, le pic  $[M-31]^+$  (perte d'un groupement méthoxy) permet d'accéder à la masse molaire et donc au nombre de carbones. Ceci n'a pas été possible dans notre étude, compte tenu que les pics  $[M-31]^+$  n'étaient pas identifiables à l'énergie utilisée. Néanmoins, chez certains d'entre eux, des ions significatifs ont été produits sous impact électronique comme l'ion  $m/z$  129. Suite à l'ion  $m/z$  75 (Mac Lafferty,  $m/z$  74+H,  $C_{1:0}$ ), les ions homologues supérieurs attendus sont à  $m/z$  88 ( $C_{2:0}$ ), 102 ( $C_{3:0}$ ), 116 ( $C_{4:0}$ ) et 130 ( $C_{5:0}$ ). Il est alors possible de concevoir que l'ion  $m/z$  129 correspond au fragment DMA  $C_{5:0}$  présentant une perte d'un proton.

Les spectres de masse des différents DMA ne fournissant que peu d'informations, et le peu d'exemples rencontrés dans la littérature, ne permettent pas de proposer les structures pour ces composés.

## P2-IV- Discussion

### IV-1- Comparaison des cultures de *Trichoderma longibrachiatum* en milieu solide et liquide

La plupart des fermentations sont réalisées à partir de culture en milieu liquide pour la production de biomasse et l'étude des lipides chez les champignons. Il était intéressant d'étudier la production lipidique et la composition en AG des souches de champignons à partir de culture en milieu liquide et solide. Cette comparaison a été réalisée sur la souche de référence *T. longibrachiatum* et a fait l'objet d'une publication (Ruiz *et al.*, 2007). L'objectif était de se placer en terme de bioproduction éventuelle dans le cas de la présence d'acides gras valorisables en santé et nutrition humaine.

#### IV-1-1- Production de biomasse, proportion de lipides et classes lipidiques

Les différences principalement observées concernent la quantité de biomasse produite, 10 fois plus importante en milieu solide qu'en milieu liquide. La proportion des lipides totaux par rapport à la biomasse est, par contre, similaire pour les deux procédés, aux alentours de 10% (*cf.* Tableau 2-4, page 77). Ces résultats confortent notre choix du milieu solide pour étudier les productions lipidiques fongiques.

Les lipides totaux obtenus à partir de la culture en milieu liquide de *T. longibrachiatum* ont également été séparés par classes de lipides (Figure 2-47).

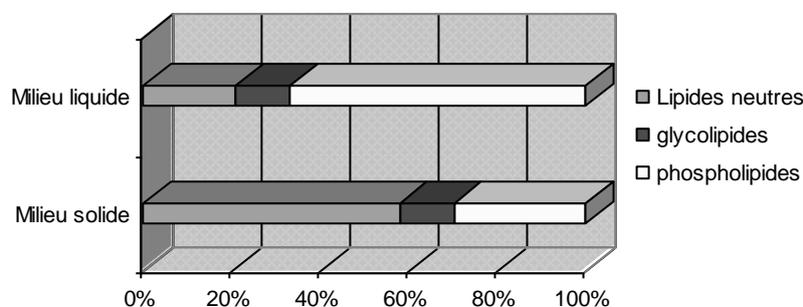


Figure 2-47 : Proportions relatives des classes lipidiques chez *T. longibrachiatum*

La comparaison des résultats obtenus en milieu liquide et en milieu solide a montré des différences notables. Ainsi, les PL correspondent à la classe majeure de lipides en culture en milieu liquide alors qu'en milieu solide, les lipides neutres sont prédominants. Cette proportion importante des PL peut s'expliquer par le fait qu'en milieu liquide, la biomasse correspond, en grande partie, à des filaments mycéliens, et donc des membranes, contrairement aux cultures en milieu solide où elle englobe à la fois du mycélium mais aussi énormément de conidies.

Pour les deux types de fermentation, les glycolipides correspondent à la classe minoritaire avec respectivement 12,2 (milieu liquide) et 12,3% (milieu solide) des lipides totaux.

## IV-1-2- Comparaison des profils d'acides gras

Le Tableau 2-13 globalise les résultats obtenus par famille d'AG (saturés, monoinsaturés, diinsaturés, 2-hydroxylés et conjugués) dans les lipides totaux et les PL à partir des deux procédés de fermentation utilisés pour *T. longibrachiatum*.

**Tableau 2-13 : Comparaison des différentes familles d'AG chez *T. longibrachiatum* à partir des cultures en milieu solide et liquide**

	Milieu solide		Milieu liquide	
	Lipides totaux	Phospholipides	Lipides totaux	Phospholipides
$\Sigma$ saturés <sup>1</sup>	35,11±0,23	21,86±1,67	35,29±1,22	35,51±4,71
$\Sigma$ monoinsaturés <sup>2</sup>	20,39±0,47	34,91±3,08	16,26±2,51	16,89±0,43
$\Sigma$ diinsaturés <sup>3</sup>	35,67±0,68	40,69±1,48	38,83±2,58	46,22±5,24
2-hydroxylés	3,72±0,41	1,79±0,18	0,46±0,02	0,15±0,08
$\Sigma$ conjugués	5,63±0,68	0,67±0,05	9,19±4,07	1,22±0,13
diinsaturés	4,51±0,53	0,48±0,03	7,21±3,53	0,75±0,08
triinsaturés	0,56±0,18	0,19±0,03	1,98±0,58	0,48±0,06

AG majoritaires : <sup>1</sup>palmitique, <sup>2</sup>oléique, <sup>3</sup>linoléique

La principale différence des compositions en AG à partir des cultures en milieu solide et en milieu liquide réside dans la variation notable de certains AG prédominants comme les acides oléique et palmitique. En effet, alors que l'acide oléique domine (33,9%) l'acide palmitique (17,2%) dans les PL (en milieu solide), l'inverse est observé à partir des cultures liquides. Pour les deux types de cultures, l'acide oléique correspond à l'AG toujours majoritairement présent aussi bien dans les lipides totaux que dans les PL. L'acide stéarique est toujours présent en plus faible quantité dans les PL, ce qui laisse suggérer que le rôle de ce dernier n'est pas de type structural.

Les 2-OH-AG sont prédominants et présents en plus grand nombre dans les lipides totaux obtenus à partir des cultures solides par rapport aux cultures liquides.

La principale différence entre les deux procédés va concerner le nombre et la quantité plus importante d'AGC produits par *T. longibrachiatum* lorsque celui-ci est cultivé en milieu liquide et exclusivement au niveau des lipides totaux. Quelque soit le type de procédé, les AGC prédominant dans les lipides totaux par rapport aux PL. Parmi eux, les ALC, majoritaires, sont détectés dans les deux types de fermentation et représentent 5,6% et 9,2% des AGT. Leurs proportions plus importantes dans les lipides totaux que dans les PL suggèrent que les ALC ne jouent pas un rôle structural.

Dans le but d'étudier exclusivement les AGC, il ne semble donc pas intéressant de se focaliser sur la fraction méthanol qui contient les PL mais plus judicieux de travailler directement sur les lipides totaux. Nous n'avons pas étudié, chez les souches de *Trichoderma*, la composition en AGTG. Afin de mieux cibler la localisation des AGC, il serait intéressant d'analyser les TG, sachant que ces derniers représentent environ 70% des lipides neutres chez les deux souches de *Trichoderma*.

Au vu de ces résultats, il est intéressant de noter qu'en fonction du but recherché, la question du choix du type de procédé doit être posé. Ainsi, les cultures en milieu solide correspondent à un procédé rapide qui permet un criblage efficace des souches de la mycothèque en vue de rechercher des AG

valorisables. Les cultures en milieu liquide semblent plus appropriées par contre en terme de proportion d'AGC dans la composition des AGT, du moins chez cette souche particulière.

Nous avons montré que les AGC étaient présents en proportion plus importante dans les lipides totaux et rentraient beaucoup moins dans la composition des PL, et ce, pour les deux types de procédés de fermentation. Les AG des lipides totaux renferment, en plus des AGPL, les AGTG et les AG rentrant dans la composition des glycolipides. Compte tenu que les glycolipides correspondent à la classe lipidique minoritairement produite par la souche pour les deux types de procédé de fermentation, il peut être supposé que la composition en AG des lipides totaux reflète principalement les AGTG et les AGPL.

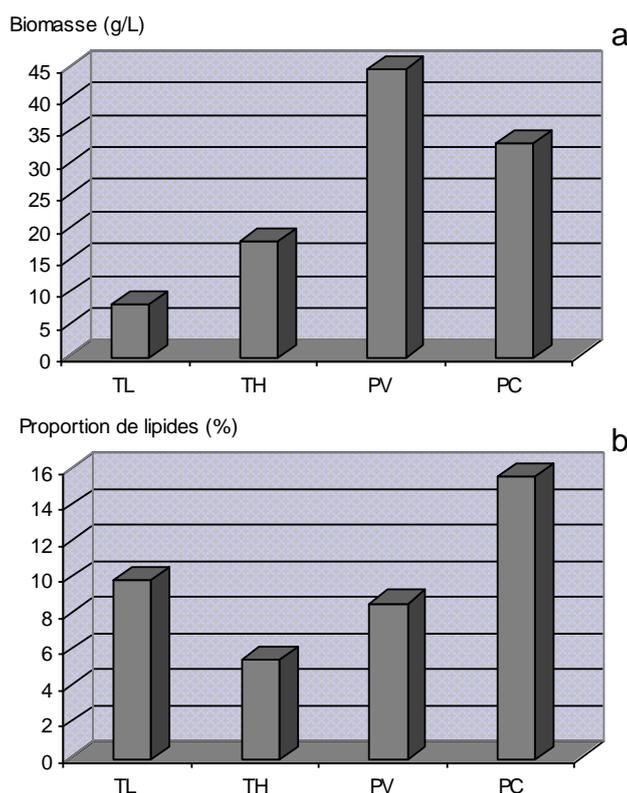
En considérant, d'après les résultats obtenus, que les AGC rentrent peu dans la composition en AGPL et que les PL sont majoritaires lorsque *T. longibrachiatum* est cultivé en milieu liquide, la production d'AGC doit être plus importante à partir des cultures réalisées en milieu solide où les lipides neutres sont majoritaires par rapport aux PL. Pour confirmer cette hypothèse il serait intéressant d'étudier la composition en AGTG à partir des deux types de cultures et d'estimer la production d'AGC.

L'utilisation du milieu de culture solide semble donc correspondre à une bonne approche pour une analyse rapide de la composition en AG des champignons isolés des zones conchyliques et la recherche d'AG originaux tels que les AGC.

## IV-2- Comparaison des profils lipidiques des quatre souches cultivées en milieu solide

### IV-2-1- Production de biomasse et proportion des lipides totaux

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, les quatre souches ont été cultivées en milieu solide, sur boîte de Petri. Les biomasses et les proportions de lipides totaux obtenues après l'étape extractive sont présentées Figure 2-48.



**Figure 2-48 : Rendements de culture (a) et proportions lipidiques (b) des différents champignons étudiés**

TL : *Trichoderma longibrachiatum*; TH : *Trichoderma harzianum*  
 PV : *Penicillium vermiculatum*; PC : *Penicillium citreonigrum*

De grandes disparités apparaissent, que ce soit pour les espèces communes à un même genre ou les espèces des deux genres. Ainsi, les deux souches de *Trichoderma* présentent des productions de biomasse et de lipides différentes entre elles. *Trichoderma harzianum* présente un rendement de culture environ deux fois plus important que *T. longibrachiatum* (18,1 contre 8,3 g/L) mais, par contre, produit environ deux fois moins de lipides (5,5 contre 9,9%). De la même façon, des différences notables de production de biomasse et de lipides sont observées chez les deux espèces du genre *Penicillium*. Ainsi, *Penicillium vermiculatum* produit plus de biomasse, mais contient une proportion lipidique plus faible que *P. citreonigrum*.

La production de biomasse est plus importante pour les deux champignons du genre *Penicillium* que pour celles de *Trichoderma*. En effet, la biomasse produite par litre de culture est supérieure à 20 g pour les souches de *Penicillium*, contrairement à celles du genre *Trichoderma*. Cette différence peut s'expliquer en partie par la méthode de récupération de la biomasse qui diffère entre les deux genres de champignons. En effet, pour les souches de *Penicillium*, toutes les colonies sont séparées de la surface

gélifiée par simple décollement. Pour des raisons pratiques concernant les deux souches de *Trichoderma*, seuls sont récupérés le thalle fragmenté et les spores : une « partie » du champignon forme un tapis très fin et ne peut être séparée de la gélose dans ces conditions.

Sur les quatre souches étudiées, seul *P. citreonigrum* présente une proportion de lipides assez importante correspondant à plus de 15 % de la biomasse totale. Les valeurs de biomasse et de production lipidique sont en accord avec les travaux précédemment publiés sur des espèces terrestres proches.

Au sujet des souches de *Trichoderma*, les principaux travaux concernent les espèces terrestres *T. reesei*, *T. viride* (Ballance et Crombie, 1961; Serrano-Carreón *et al.*, 1992a) et *T. harzianum* (Serrano-Carreón *et al.*, 1992a).

Exceptée la quantité de biomasse plus importante obtenue pour *T. harzianum* (18,1 g/L) dans notre étude, les concentrations de biomasse observées d'après la littérature pour les espèces de *Trichoderma* ne dépassent guère les 15 g/L et s'échelonnent globalement entre 5 et 10 g/L, comme c'est le cas pour *T. longibrachiatum*.

Les proportions lipidiques varient par contre beaucoup plus entre les espèces au sein du genre *Trichoderma*. Par exemple, les lipides totaux représentent 17% de la biomasse totale chez *T. reesei* (Brown *et al.*, 1990) alors qu'ils représentent le quart de la biomasse chez *T. harzianum* (Serrano-Carreón *et al.*, 1992a). Ces valeurs sont plus importantes que celles que nous obtenons pour nos souches qui ne dépassent pas les 10%. Néanmoins, pour *T. viride*, des valeurs très différentes sont obtenues en fonction des publications : 5-10% (Ballance et Crombie, 1961) jusqu'à 35% (Serrano-Carreón *et al.*, 1992a). Ces études réalisées sur ces espèces terrestres de *Trichoderma* montrent que l'accumulation lipidique dépend réellement des différents paramètres de culture comme la composition du milieu, le pH et la température et qu'en conditions optimales, le contenu lipidique global peut atteindre des niveaux plus élevés. Néanmoins ces études révèlent également que des variabilités inter et intraspécifiques existent dans la production lipidique de ces champignons.

Peu de données concernent les études lipidiques de souches appartenant au genre des *Penicillium*. L'étude de Pohl (1997) sur la production de GLA par des Ascomycètes (levures et moisissures) dont *Talaromyces flavus*, la forme téléomorphe de *P. vermiculatum*, donne des concentrations maximales de biomasse de l'ordre de 1g/L de culture. Ces valeurs correspondent à des cultures en milieu liquide et restent très faibles par rapport aux quantités que nous avons produites en milieu solide. Excepté cette étude, nous n'avons pas pu comparer nos quantités de biomasses obtenues avec celles d'autres travaux.

Par contre, la proportion lipidique de la biomasse sèche est d'avantage décrite. La proportion lipidique est assez stable pour des espèces comme *P. camembertii*, *P. roquefortii* (Lomascolo *et al.*, 1994) ou *P. chrysogenum* (Lösel, 1988), comprise entre 17 et 20% de la masse sèche. Cet ordre de grandeur est en adéquation avec les valeurs que nous avons obtenues pour *P. citreonigrum* (15,6%). Par contre, pour *P. vermiculatum*, la proportion lipidique par rapport à la masse sèche est plus faible (8,6%).

## IV-2-2- Séparation des lipides en classes

Pour chaque souche étudiée, l'extrait des lipides totaux, obtenu après extraction au dichlorométhane/méthanol a été chromatographié sur colonne ouverte de gel de silice pour séparer les trois grandes classes de lipides : lipides neutres (TG et stérols), glycolipides et enfin PL. Ceci est obtenu, respectivement, par élution successive de dichlorométhane, acétone et méthanol (Figure 2-49, page suivante).

Comme nous l'avons observé précédemment, des variations interspécifiques et intergénériques apparaissent entre les quatre souches pour les proportions de chaque classe. Globalement, la fraction acétone représente la classe lipidique la plus faible exceptée pour *P. vermiculatum* où elle se rapproche des 30%. La fraction dichlorométhane est la plus importante avec des proportions atteignant 80,8% des lipides totaux pour *P. citreonigrum*.

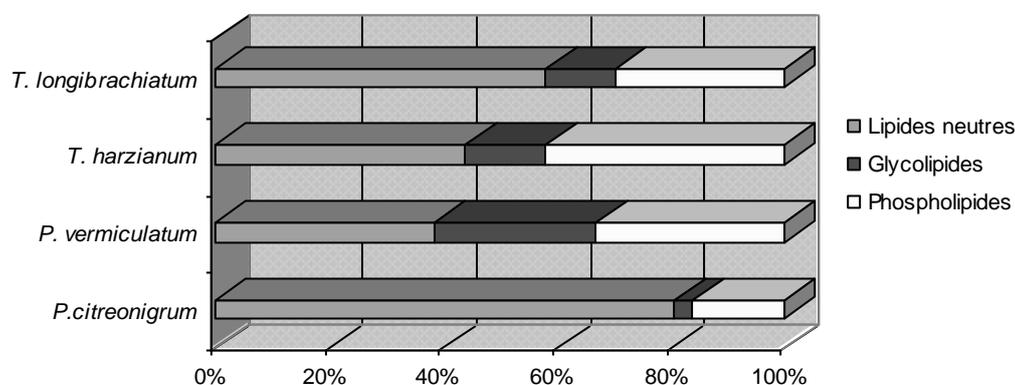


Figure 2-49 : Proportions relatives des classes lipidiques chez différents champignons étudiés

Les deux souches de *Trichoderma* présentent des proportions de fractions acétone du même ordre de grandeur, aux alentours de 15%. Ce sont les lipides polaires et les PL qui présentent le plus de disparités entre les deux espèces. Très peu de travaux relatifs à l'étude des classes lipidiques de moisissures du genre *Trichoderma* sont connus dans la littérature. Les lipides produits par *T. harzianum* et *T. viride* (Serrano-Carreón *et al.*, 1992a) en milieu glucose/sulfate d'ammonium pendant 8 jours montrent une prédominance des lipides neutres (72,9 et 63,2% respectivement) au profit des PL, en adéquation avec les proportions obtenues pour *T. longibrachiatum*.

*T. harzianum*, par contre, présente une fraction de PL plus abondante que *T. longibrachiatum* (41,9 contre 29,7%) semblable à celle des lipides neutres. Cette proportion plus importante de PL pour *T. harzianum* pourrait être corrélée à la production plus élevée de biomasse par rapport à *T. longibrachiatum*. Nous pouvons émettre l'hypothèse que, chez *T. harzianum*, la production de biomasse se traduit principalement par une augmentation des niveaux de lipides de structure alors que *T. longibrachiatum* favoriserait plutôt l'accumulation de lipides de réserve au cours de son développement, expliquant des rendements de biomasse plus faibles mais une proportion de lipides totaux plus importante.

Les deux souches de *Penicillium* se révèlent encore plus différentes en termes de classes lipidiques. Contrairement aux souches de *Trichoderma*, pour lesquelles les proportions des quantités des fractions glycolipides sont semblables, pour les deux espèces de *Penicillium*, les fractions acétone s'avèrent très disparates. En effet, la fraction acétone représente pratiquement le tiers des lipides totaux pour *P. vermiculatum* contre moins de 5% pour *P. citreonigrum*. Les mêmes constats que pour les souches

de *Trichoderma* étudiées sont effectués : la quantité plus importante de PL chez *P. vermiculatum* est associée à une plus grande production de biomasse.

L'étude de la composition lipidique des espèces *P. roquefortii* et *P. camembertii* (Lomascolo *et al.*, 1994) relate une prédominance des lipides polaires sur les lipides neutres, comme ce qui est observé pour *P. vermiculatum* où les lipides neutres ne représentent qu'un tiers des lipides totaux. Par contre *P. citreonigrum* montre un réel intérêt d'un point de vue nutritionnel. En effet, des lipides de réserve correspondent à 88% de la fraction dichlorométhane, équivalent à 70% des lipides totaux. Il est rare d'observer chez des champignons, notamment supérieurs, une quantité si importante de TG dans la biomasse. Seule cette souche présente un extrait lipidique avec l'apparence d'une huile orangée avant séparation des lipides en classes (*cf.* Figure 2-20, page 78).

### IV-2-3-Composition en acides gras

Les profils d'AG ont été réalisés à plusieurs niveaux. La composition en AGPL a été étudiée pour chaque souche, renseignant ainsi sur les lipides de structure. La composition en AGPL a été comparée à celle des AGT pour les souches de *Trichoderma* et à celle des AGTG pour les souches de *Penicillium*.

L'avantage d'étudier les AGT est d'englober à la fois les AG des lipides de réserve, les TG, et ceux des lipides membranaires incluant PL (lipides de structure) et glycolipides (lipides de signalisation et de reconnaissance cellulaire). Cette démarche peut donc présenter des atouts en terme de valorisation éventuelle de certains AG.

Globalement, la composition en AG totaux reflète assez bien celle des TG (prédominants), notamment pour les AG majoritaires chez les souches de *Trichoderma*. Pour cette raison, nous avons considéré que les compositions en AG de lipides totaux pouvaient être comparées à celles des TG entre les souches des genres *Trichoderma* et *Penicillium*.

La comparaison des profils d'AG entre les quatre souches est présentée par familles principales d'AG : saturés, monoinsaturés, diinsaturés, 2-hydroxylés et conjugués.

### IV-2-3-1- Acides gras saturés

De nombreux AGS ont été identifiés par CPG/SM chez les souches étudiées. Globalement, toutes souches confondues, 20 AG allant de l'acide dodécanoïque (12:0) jusqu'à l'acide dotriacontanoïque (32:0) ont été mis en évidence constituant ainsi la famille d'AG la plus étendue (Tableau 2-14).

**Tableau 2-14 : Composition en AGS (% massiques)**

	<i>T. longibrachiatum</i>			<i>T. harzianum</i>		<i>P. vermiculatum</i>		<i>P. citreonigrum</i>	
	LCE	LT	PL	LT	PL	TG	PL	TG	PL
12:0	12,00	-	-	0,10	0,13	-	-	-	-
14:0	14,00	0,50	0,40	0,57	0,33	0,87	0,10	0,57	0,51
<i>ai</i> -15:0	14,71	-	-	tr.	-	-	-	-	-
15:0	15,00	1,27	0,63	3,00	1,26	0,74	0,89	0,12	0,43
16:0	16,00	19,07	17,21	20,20	19,21	18,12	24,49	16,17	24,81
17:0	17,00	1,07	0,47	1,75	0,73	1,47	0,52	-	-
18:0	18,00	10,65	2,60	8,26	2,19	16,65	1,82	13,90	4,49
19:0	19,00	0,52	-	tr.	-	0,10	-	tr.	-
20:0	20,00	0,40	-	0,63	0,16	2,26	tr.	3,22	0,11
21:0	21,00	0,13	-	-	-	tr.	-	tr.	-
22:0	22,00	0,16	0,32	0,51	0,31	1,98	tr.	1,56	tr.
23:0	23,00	0,12	-	0,28	-	0,20	-	tr.	-
24:0	24,00	0,99	0,10	1,28	0,56	4,67	0,18	0,90	0,16
25:0	25,00	0,19	-	0,42	-	0,15	-	-	-
26:0	26,00	0,12	0,13	0,42	-	0,25	-	-	-
27:0	27,00	-	-	tr.	-	-	-	-	-
28:0	28,00	tr.	-	0,17	-	-	-	-	-
29:0	29,00	-	-	0,67	-	-	-	-	-
30:0	30,00	-	-	0,15	-	-	-	-	-
32:0	32,00	-	-	tr.	-	-	-	-	-
Σ saturés		35,19	21,86	38,41	24,88	47,55	27,90	36,98	30,51

tr. : traces, pourcentages inférieurs à 0,1%

Des points communs et des disparités apparaissent entre les souches en ce qui concerne premièrement la proportion des AGS. Ainsi, pour les souches de *Trichoderma*, la proportion d'AGS est plus importante dans les lipides totaux (35-38%) que dans les PL (21-25%), suggérant que ces AG sont peut-être plus stockés avec les lipides de réserve que mis à profit dans les membranes, même si les TG n'ont pas été étudiés en tant que tels pour ces deux souches.

Pour les deux souches de *Penicillium*, des différences de proportion des AGS sont observées. *Penicillium vermiculatum* présente une proportion plus importante d'AGS dans les TG (presque 50%), que dans les PL (27%) alors que chez *P. citreonigrum*, des proportions semblables sont observées aussi bien pour les TG que pour les PL.

La composition en AGS va, elle, dépendre de la souche considérée. Le principal AGS présent majoritairement chez les quatre souches, mais aussi chez les êtres vivants, est l'acide palmitique. Chez les deux champignons du genre *Trichoderma*, il présente une répartition homogène entre lipides totaux et PL qui est comprise entre 17 et 20%. Chez les souches de *Penicillium*, l'acide palmitique est légèrement plus concentré dans les PL que dans les TG.

Le deuxième AGS important est l'acide stéarique. Ce dernier rentre faiblement dans la composition des PL chez les souches de *Trichoderma* et est en quantité plus importante dans les lipides totaux,

traduisant donc qu'il doit être stocké dans les lipides de réserve. Pour les souches de *Penicillium*, il est légèrement plus important chez *P. vermiculatum* que *P. citreonigrum* mais prédomine dans les TG. Au vu de ces résultats, nous pouvons supposer que l'acide stéarique est principalement destiné à un rôle énergétique chez ces champignons contrairement à l'acide palmitique, plus variable selon les souches.

Ces observations sont en adéquation avec les travaux de Serrano-Carreón *et al.* (1992b) qui portaient sur l'étude des classes lipidiques de deux souches terrestres de *Trichoderma*. En effet, l'acide stéarique était faiblement présent dans les PL par rapport aux lipides neutres. Par contre, des variations moins importantes étaient observées entre ces classes lipidiques pour l'acide palmitique.

Concernant le genre *Penicillium*, les travaux réalisés sur trois espèces terrestres, une souche de *P. camembertii* et deux souches de *P. roquefortii*, montrent peu de variations des proportions des acides stéarique et palmitique entre lipides polaires et lipides neutres (Lomascolo *et al.*, 1994).

Pour les souches de *Trichoderma*, la composition en AG des lipides totaux est plus variée que celle des PL avec notamment de nombreux AG à longue chaîne détectés à plus de 24 carbones. Malgré leurs très faibles proportions, il est intéressant de voir que des AG à longue chaîne tels que les acides nonacosanoïque (29:0), triacontanoïque (30:0) et dotriacontanoïque (32:0) (*cf.* Figure 2-24, page 86) ont été identifiés chez *T. harzianum*. En effet, il s'agit d'AGS peu représentés, aussi bien dans le règne fongique, les plus longs décrits n'excédant pas 28 carbones chez les Basidiomycètes (Rezanka *et al.*, 1999), que chez les autres organismes vivants.

Chez les deux souches de *Penicillium*, les mêmes AG sont retrouvés dans les TG et PL, cependant avec des proportions qui peuvent varier. Les AG les plus longs n'excèdent pas 26 carbones mais sont présents en proportion plus importante que chez les *Trichoderma* sp., notamment pour l'acide eicosanoïque présent à plus de 2%. Notons la présence de l'acide tétracosanoïque (24:0) à plus de 4% chez *P. vermiculatum* alors que sa proportion n'excède pas 1% chez *P. citreonigrum*.

Très peu de travaux ont décrit l'identification d'AG à très longue chaîne chez les champignons. Il s'agit de la première description de tels AG pour le genre *Trichoderma*. Pour le genre *Penicillium*, certains travaux ont déjà rapporté la présence d'AGS à longue chaîne comme le 24:0 ou l'acide pentacosanoïque (25:0) et ce, dans des proportions pouvant atteindre jusqu'à 3,7% chez *P. roquefortii* selon l'âge de la culture et la fraction analysée (polaire ou neutre) (Lomascolo *et al.*, 1994). De même, Lopes da Silva *et al.*, (1998), qui ont utilisé le profil d'AG pour différencier 18 espèces de *Penicillium* ont rapporté des proportions de l'acide 24:0 de 2,25% chez *P. expansum*.

Il est également important de noter la présence d'AG à nombre impair de carbones qui ont été très peu décrits chez les champignons. Jamais décrits chez le genre *Trichoderma*, les AG impairs l'ont été toutefois chez les *Penicillium* sp. Les deux études précédemment citées relatent en effet la présence d'acide pentadécanoïque (15:0) et heptadécanoïque (17:0) chez le genre *Penicillium* dans des proportions dépassant rarement les 2%. L'acide nonadécanoïque est, par contre, très peu observé chez les champignons tout comme les AG à plus longues chaînes tels que les acides heptacosanoïque (27:0) et nonacosanoïque (29:0).

Il est important de noter que l'acide 17:0 a été observé chez toutes les souches, exceptée *P. citreonigrum*. Ceci est d'autant plus original que c'est précisément chez cette dernière qu'une série de plusieurs AGI à 17 carbones a été détectée.

La présence d'AGS ramifiés en position *anteiso*, comme c'est le cas chez *T. harzianum*, est également originale chez les champignons. Néanmoins, de tels AG ont déjà été décrits chez plusieurs genres de Basidiomycètes (Rezanka *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 2006).

### IV-2-3-2- Acides gras monoinsaturés

Les AG monoinsaturés (AGMI) identifiés chez les quatre souches appartiennent aux séries n-7, n-8, n-9 et n-10. Leur proportion est assez variable en fonction des souches et des lipides étudiés (Tableau 2-15).

**Tableau 2-15 : Composition en acides gras monoinsaturés (% massiques)**

		<i>T. longibrachiatum</i>			<i>T. harzianum</i>		<i>P. vermiculatum</i>		<i>P. citreonigrum</i>	
	Séries	LCE	LT	PL	LT	PL	TG	PL	TG	PL
9-16:1	n-7	15,79	2,12	0,73	4,56	0,87	1,72	1,29	1,36	3,61
4-Me-16:1	*	16,16	-	-	-	-	-	-	0,60	0,25
9-17:1	n-8	16,84	0,71	0,28	1,01	0,82	0,54	0,40	-	-
9-18:1	n-9	17,86	17,47	33,91	5,72	20,10	10,29	15,53	25,08	8,90
9-19:1	n-10	18,71	-	-	0,11*	-	tr.	0,72	-	-
10-19:1	n-9	18,76	-	-	-	-	0,11	-	-	-
9-19:1	n-10	18,83	-	-	-	-	0,37	-	-	-
10-20:1	n-10	19,75	-	-	-	-	-	-	0,15	-
11-20:1	n-9	19,80	0,10	-	tr.	-	0,43	1,17	0,42	0,18
13-22:1	n-9	21,72	-	-	-	-	tr.	tr.	0,13*	-
14-24:1	n-10	23,73	-	-	-	-	0,19	-	tr.*	-
Σ monoinsaturés			20,40	34,92	11,40	21,79	13,65	19,11	27,74	12,94

\* position de l'insaturation indéterminée

De grandes variations apparaissent entre les souches sur la proportion des AGMI des mélanges analysés. Ainsi, chez *T. harzianum* et *T. longibrachiatum*, les monoinsaturés sont plus importants dans les PL. Pour *P. vermiculatum*, les AGMI sont sensiblement plus importants également chez les PL que les TG alors que le contraire est observé pour *P. citreonigrum*.

L'AGMI prédominant chez les quatre souches est l'acide oléique. Il est présent en proportion très variable selon les espèces étudiées. Pour les souches de *Trichoderma*, l'acide oléique est plus abondant dans les PL que dans les lipides totaux. *T. longibrachiatum* présente le taux le plus élevé des quatre souches. Pour les deux souches de *Penicillium*, les proportions d'acide oléique sont comprises entre 8 et 15% en fonction de la souche et des lipides étudiés.

Concernant le genre *Trichoderma*, les taux observés pour l'acide oléique dans la littérature sont plus généralement en adéquation avec les valeurs concernant *T. longibrachiatum*. Souvent même, l'acide oléique domine l'acide linoléique, ce qui n'est pas le cas chez nos souches (Ballance et Crombie, 1961; Serrano-Carreón *et al.*, 1992b). Les souches de *Penicillium* montrent plus de divergences que celles de *Trichoderma*. Les études réalisées sur plusieurs espèces de *Penicillium* rapportent des taux d'acide oléique très variables en fonction des espèces étudiées. Dart *et al.*, (1976) qui ont travaillé sur 17 espèces de *Penicillium* ont montré que les proportions d'acide oléique total variaient entre 10% (*P. griseofulvum*) et 49% (*P. lavendulum*). Plus récemment, les travaux de Lopes da Silva *et al.*, (1998) ont corroboré cette fluctuation, avec des taux allant de 7% (*P. chrysogenum*) jusqu'à plus de 50% (*P. atramentosum*). Les proportions de l'acide oléique dans les TG et les PL retrouvées chez nos deux espèces de *Penicillium* sont

en adéquation avec les valeurs décrites par Lomascolo *et al.* (1994). En effet, ces dernières sont comprises entre 8 et 20% selon les souches, l'âge des cultures et les fractions lipidiques étudiées (polaires ou neutres).

Il est intéressant de noter que d'autres AGMI, présents en faibles proportions ont également été mis en évidence. L'acide palmitoléique (insaturé en position C-9/C-10) a été identifié chez les quatre souches. Il représente 3,6% des AG des PL chez *P. citreonigrum* et 4,6% des AG dans les lipides totaux de *T. harzianum*.

L'acide palmitoléique correspond, après l'acide oléique, à l'AGMI le plus fréquemment retrouvé chez les champignons (Brennan *et al.*, 1975; Lösel, 1988; Stahl et Klug, 1996). Il est présent très souvent chez les Basidiomycètes (Rezanka *et al.*, 1999). Cox *et al.* (2006) ont par exemple mis en évidence les isomères 5-16:1 et 10-16:1 chez des Armillaires. Mais ce sont les isomères 7-16:1 et 9-16:1 qui sont le plus souvent détectés chez les Basidiomycètes (Rezanka *et al.*, 1999; Dimou *et al.*, 2002; Pedneault *et al.*, 2006). L'acide palmitoléique est également présent chez des champignons inférieurs comme *Phytophthora infestans*, Oomycète parasite des tomates et des pommes de terre (Griffiths *et al.*, 2003b) ou chez les Mucorales (Zygomycètes) (Sumner *et al.*, 1969; Konova *et al.*, 2002).

Chez certains champignons comme *Pythium* sp. (Oomycètes) ou *Acremonium persicinum* (Ascomycètes) il peut même correspondre à l'AG majoritaire (Stahl et Klug, 1996). Enfin, il rentre également dans la composition en AG de certains Ascomycètes marins comme *Cirrenalia pygmea*, pour lequel sa teneur, en fonction de la salinité du milieu de culture, peut atteindre 18% (Ravishankar *et al.*, 1994), ou *Corrolospora maritima*, *Dendryphiella salina* (9-16:1) (Cooney *et al.*, 1993).

Concernant les moisissures, il a été plusieurs fois identifié pour le genre *Penicillium* (Lomascolo *et al.*, 1994; Lopes da Silva *et al.*, 1998) dans des proportions voisines de celles que nous avons trouvées chez nos souches. Par contre, l'acide palmitoléique a été très peu décrit chez le genre *Trichoderma*. Néanmoins, Brown *et al.*, (1990) ont montré que pour *T. reesei*, dans certaines conditions de température et de pH, une conversion des acides palmitique, stéarique et oléique en acide palmitoléique pouvait avoir lieu lorsque le taux maximal de production lipidique était atteint. Dans ces conditions, l'acide palmitoléique devenait majoritaire, avec des proportions dépassant les 75%.

Un autre AG intéressant à signaler est l'acide heptadécénoïque 9-17:1, compris entre 0 et 1% chez *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* et *P. vermiculatum* (le spectre de masse du NAP du 9-17:1 identifié dans les TG de *P. vermiculatum* est présenté Figure 2-10, page 63). L'acide heptadécénoïque a été également décrit dans les mêmes proportions chez le genre *Penicillium* (Lomascolo *et al.*, 1994; Lopes da Silva *et al.*, 1998) et les Basidiomycètes comme les cèpes (9-17:1) (Pedneault *et al.*, 2006). Rezanka *et al.* (1999) ont montré, lors de l'étude des AG de plusieurs espèces de Basidiomycètes, que les isomères 8-17:1 et 10-17:1 étaient présents, ensemble, chez huit espèces sur les neuf étudiées. La présence de l'acide heptadécénoïque est aussi signalée chez certains champignons inférieurs appartenant aux Oomycètes et Zygomycètes (Stahl et Klug, 1996). Malgré tout, il n'en demeure pas moins un AG rare chez les champignons et n'a jamais été décrit auparavant chez le genre *Trichoderma*.

Chez *P. citreonigrum*, l'acide 9-17:1 n'a pas été identifié. Par contre il faut noter la présence de l'acide ramifié 4-méthylhexadécénoïque (4-Me-16:1) présent à la fois dans les PL et TG.

Un autre AGMI à nombre impair de carbones, l'acide nonadécénoïque a été identifié chez les souches *T. harzianum* et *P. vermiculatum* en faible quantité. Trois isomères ont été identifiés dans les TG

de *P. vermiculatum* (cf. Figure 2-25, page 88). Pour *T. harzianum*, l'EM de l'acide 9-19:1 n'était présent qu'à l'état de trace et il n'a pas été observé sous sa forme NAP.

L'acide nonadécénoïque demeure un AG très inhabituel. Plusieurs isomères de position de l'acide nonadécénoïque ont été identifiés exclusivement dans l'environnement marin. C'est principalement dans les PL des éponges marines qu'ils ont été décrits comme par exemple les 6-19:1 et 4-19:1, identifiés respectivement chez les éponges caribéennes *Geodia gibberosa* (Carballeira et Rodriguez, 1991) et *Amphimedon viridis* (Carballeira et Shalabi, 1994), le 13-19:1 chez l'éponge sénégalaise *Cinachyrella alloclada* (Barnathan *et al.*, 1992) ou encore le 12-19:1 chez l'éponge néo-calédonienne *Cinachyrella aff. schulzei* (Barnathan *et al.*, 1994). En 2001, l'équipe de Carballeira a identifié une série intéressante de cinq isomères de position en C-7, C-9, C-11, C-12 et C-13, chez le mollusque *Siphonaria denticulata* originaire du Queensland en Australie.

En ce qui concerne les champignons, à notre connaissance, trois publications décrivent la présence d'acide nonadécénoïque : chez *Penicillium paraherquei* (Stahl et Klug, 1996), *Erysiphe graminis*, Ascomycète responsable du mildiou chez le blé (Johnson *et al.*, 1976) et les Basidiomycètes *Stereum hirsutum*, *Lachnea scutellata*, *Mycena galericulata*, *Ganoderma lucidum*, *Piptoporus betulinus*, *Lycoperdon perlatum*, *Morchella esculenta* et *Suillus luteus* (Rezanka *et al.*, 1999).

L'acide eicosénoïque (20:1) de la série n-9, faiblement représenté, a été identifié chez les quatre souches étudiées (cf. spectre de masse du NAP, Annexe 3). Comme pour l'acide palmitoléique, il a été décrit chez des champignons très variés, comme des Ascomycètes marins (Cooney *et al.*, 1993), des Basidiomycètes (Rezanka *et al.*, 1999; Pedneault *et al.*, 2006), des Zygomycètes (Stahl et Klug, 1996) dans des proportions dépassant rarement 1%. Il est présent à plus de 2% des AG totaux chez certains Oomycètes comme *Pythium* sp. (Stahl et Klug, 1996) ou *Phytophthora infestans* (Griffiths *et al.*, 2003b).

Il s'agit de la première description de cet AG pour le genre *Trichoderma*. Par contre, il a été décrit chez plusieurs espèces du genre *Penicillium* dans des proportions rarement supérieures à 0,5% des AG totaux (Lomascolo *et al.*, 1994; Lopes da Silva *et al.*, 1998).

Les deux derniers AGMI correspondant aux acides docosénoïque (22:1) et tétracosénoïque (24:1) concernent uniquement les deux souches *P. vermiculatum* et *P. citreonigrum*. Les positions des insaturations, respectivement en C-13 et en C-14 pour ces deux AG, n'ont pu être déterminées que pour *P. vermiculatum* par analyse de leurs dérivés NAP (cf. Annexe 3 pour le spectre de masse du NAP du 13-22:1 et Figure 2-26, page 90, pour le spectre NAP du 14-24:1).

Les acides 13-22:1 et 15-24:1 (n-9) ont déjà été décrits chez les cèpes par Pedneault *et al.* (2006). D'autres isomères des séries n-11 (11-22:1 et 13-24:1) ont été mis en évidence chez les neuf souches de Basidiomycètes étudiées par Rezanka et son équipe (Rezanka *et al.*, 1999). Ces derniers ont d'ailleurs mis en évidence toute une série d'AGMI allant de l'acide dodécénoïque (7-12:1) jusqu'à l'acide triaconténoïque (30:1), exceptés ceux à 23 et 29 carbones (acides tricosénoïque et nonacosénoïque). Les acides 22:1 et 24:1 ont également été décrits en proportion importante (12 et 15% respectivement des AG totaux) chez *Erysiphe graminis* par Johnson (1976). Néanmoins, c'est également le cas chez l'Oomycète *Pythium ultimum* où le 22:1 représente jusqu'à 7% des AGT (Bowman et Mumma, 1967). Plus récemment, toujours chez la même espèce, l'isomère 13-22:1 a été décrit comme correspondant à l'un des deux AG constituant une céramide-phosphoryléthanolamine (Moreau *et al.*, 1998).

Par contre l'acide 10-24:1 (n-10), correspond à un isomère de position très rare, les isomères les plus connus correspondant à ceux des séries n-6, n-7 et n-9 (18-24:1, 17-24:1 et 15-24:1).

### IV-2-3-3- Acides gras diinsaturés

Les AG diinsaturés (non conjugués) retrouvés chez les quatre souches sont représentés majoritairement par l'acide linoléique. (Tableau 2-16).

**Tableau 2-16 : Composition en acides gras diinsaturés non conjugués (% massiques)**

	Série	<i>T. longibrachiatum</i>			<i>T. harzianum</i>		<i>P. vermiculatum</i>		<i>P. citreonigrum</i>	
		LCE	LT	PL	LT	PL	TG	PL	TG	PL
15:2	*	14,79	-	-	-	-	-	-	tr.	-
9,12-16:2	n-4	15,63	-	-	tr.	-	-	-	-	-
9,12-17:2	n-5	16,71	0,58	0,41	0,68	0,33	0,41	tr.	-	-
9,12-18:2	n-6	17,66	34,96	40,29	39,42	51,03	34,80	48,81	12,64	43,18
19:2	*	18,84	-	-	-	-	-	-	0,33	-
11,14-20:2	n-6	19,66	0,13	-	0,21	-	0,53	tr.	0,43	0,20
Σ diinsaturés			35,67	40,70	40,31	51,13	35,74	48,81	13,40	43,38

\*Localisation des liaisons indéterminée

L'acide linoléique 9,12-18:2 n-6 correspond à l'AG polyinsaturé majoritaire, présent plus abondamment dans les PL que dans les lipides totaux pour chez les quatre souches étudiées. Il correspond, toutes fractions lipidiques confondues, à l'un des AG majoritaires chez les champignons avec l'acide palmitique et l'acide oléique (Brennan *et al.*, 1975; Lösel, 1988; Stahl et Klug, 1996).

Concernant les souches de *Trichoderma*, les proportions de l'AL sont en adéquation avec les travaux antérieurs publiés par Ballance et Crombie (1961) sur *T. viride* et Serrano-Carreón *et al.*, (1992b) sur *T. viride* et *T. harzianum* qui montraient que l'AL était plus concentré dans les PL que dans les lipides neutres et TG, pouvant atteindre jusqu'à pratiquement 70% des AG des PL chez *T. harzianum*. Il est intéressant de noter la proportion proche observée pour *T. harzianum* dans notre étude. Chez *T. longibrachiatum*, des variations moins importantes apparaissent entre lipides totaux (34,96%) et PL (40,29%).

Pour les deux souches de *Penicillium*, les PL présentent des taux d'AL compris entre 43 et 49%. Par contre, *P. citreonigrum* montre un taux d'AL plus faible dans les TG (12,64%) que *P. vermiculatum* (34,99%). Ces différences entre lipides polaires et lipides neutres sont moins observées chez les espèces *P. camembertii* et *P. roquefortii* (Lomascolo *et al.*, 1994).

L'acide hexadécadiénoïque de la série n-4 (9,12-16:2) a été identifié à l'état de trace uniquement chez *T. harzianum*. Cet AG est très inhabituel chez les champignons. Néanmoins, il a été démontré qu'une souche de *Trichoderma* sp. isolée d'un prélèvement d'eau douce était capable de convertir l'acide palmitoléique de la série n-7 (9-16:1) en acide 9,12-hexadécadiénoïque par une désaturation en  $\Delta$ 12 (Shirasaka *et al.*, 1998).

Dans une publication plus récente, cette même équipe a également montré que l'acide hexadécatriénoïque (9,12,15-16:3) pouvait être produit par cette souche via une  $\Delta$ 15 désaturase à partir de l'acide 9,12-16:2 en mimant la voie des ALA (Shirasaka *et al.*, 2005). Il s'agit des seules publications concernant la présence d'acide hexadécadiénoïque chez des *Trichoderma*. Ces études confirment la présence de l'acide palmitoléique (série n-7) chez les deux souches de *Trichoderma* et de l'acide hexadécadiénoïque (série n-4) chez *T. harzianum*. L'acide 9,12-16:2 a également été observé dans les

lipides totaux d'autres champignons, notamment chez les 9 espèces de Basidiomycètes étudiées par Rezanka *et al.* en 1999.

L'acide eicosadiénoïque 11,14-20:2 n-6 retrouvé chez toutes les souches a déjà été décrit chez des espèces de *Penicillium* dans des proportions similaires (Lomascolo *et al.*, 1994; Lopes da Silva *et al.*, 1998), mais jamais chez le genre *Trichoderma*. Il a également été observé chez de nombreux Basidiomycètes appartenant à la famille des Boletaceae comme *Boletus edulis* (cèpe de Bordeaux) ou *B. erythropus* (cèpe à pied rouge) (Pedneault *et al.*, 2006) mais aussi chez d'autres espèces comme *Stereum hirsutum*, *Coriolus versicolor* (Rezanka *et al.*, 1999), ou encore, *Trametes versicolor* (Stahl et Klug, 1996).

L'acide heptadécadiénoïque 9,12-17:2 a été identifié chez toutes les souches exceptée *P. citreonigrum*. Il s'agit de la première description de cet AG chez le genre *Trichoderma*. En ce qui concerne le genre *Penicillium*, Lomascolo *et al.* (1994) rapportent la présence d'acide heptadécadiénoïque chez les espèces *P. camembertii* et *P. roquefortii* sans pour autant déterminer la position des insaturations.

Chez *P. citreonigrum*, il est important de noter la présence de deux AGDI inhabituels à 15 et 19 carbones. La position des doubles liaisons n'a pu être déterminée pour ces deux AG. Ces AGDI présentent des valeurs de LCE élevées, respectivement de 14,79 et 18,84. De telles valeurs peuvent s'expliquer par la position des doubles liaisons. Christie (1988) a étudié la variation des valeurs de la LCE de toute une série d'isomères de position monoinsaturés et diinsaturés. Pour les acides présentant les insaturations proches de l'une ou de l'autre des extrémités de la chaîne, les valeurs de LCE sont d'un ordre de grandeur nettement supérieur à celles observées pour des insaturations situées dans la zone médiane. Ainsi, par exemple, les isomères 3,6 et 14,17-18:2 présentent des LCE plus élevées (17,73 et 17,90 respectivement) que le 9,12-18:2 (LCE = 17,65) sur une phase stationnaire phényl-méthyl-silicone.

En tenant compte des travaux de Christie, nous pouvons supposer que les LCE obtenues pourraient traduire, pour les AG 15:2 et 19:2, une localisation des insaturations proche ou éloignée de l'extrémité fonctionnelle.

Il est important de mentionner que nous n'avons pas détecté d'AGPI chez les quatre souches étudiées, excepté les AGC (nous y reviendrons ultérieurement) alors que l'ALA est pourtant retrouvé chez de nombreuses espèces terrestres de *Penicillium* comme l'ont montré les travaux de Lopes da Silva *et al.* (1998). Dans cette étude, l'ALA était présent dans les lipides totaux chez la moitié des espèces analysées. Les travaux de Lomascolo *et al.* (1994) ont également rapporté la présence d'ALA dans des proportions non négligeables, aussi bien dans les fractions neutres (11,6 à 12%) que dans les fractions polaires (8,3 à 11%) chez *P. camembertii* en fonction de l'âge de la culture.

#### IV-2-3-4- Acides gras 2-hydroxylés

Plusieurs acides gras hydroxylés en position 2 ont été identifiés chez les champignons étudiés. Les 2-OH-AG observés chez les quatre souches sont présentés Tableau 2-17. Cinq 2-OH-AG ont été décelés, constitués de 18, 22, 24, 25 et 26 carbones (cf. Figure 2-13, page 66, Figure 2-21, page 81 et Annexe 3).

**Tableau 2-17 : Composition en acides gras 2-hydroxylés**

	<i>T. longibrachiatum</i>			<i>T. harzianum</i>		<i>P. vermiculatum</i>		<i>P. citreonigrum</i>	
	LCE	LT	PL	LT	PL	TG	PL	TG	PL
2-OH-18:0	19,13	0,59	0,61	0,37	0,23	-	0,20	-	-
2-OH-22:0	23,23	-	-	-	-	-	-	-	0,33
2-OH-24:0	25,28	2,89	0,99	0,14	0,10	-	1,94	-	1,03
2-OH-25:0	26,29	0,17	0,11	-	0,11	-	-	-	-
2-OH-26:0	27,30	tr.	tr.	-	-	-	-	-	-
Σ 2-hydroxylés		3,65	1,71	0,51	0,44	-	2,13	-	1,36

Un léger glissement des LCE est observé lorsque le nombre de carbones augmente (de 19,13 à 27,30). Ce phénomène a déjà été décrit lors de l'étude d'AG hydroxylés isolés d'éponges marines du Sénégal (Barnathan *et al.*, 1993).

Des différences sont observées en fonction des souches :

- l'acide 2-OH-24:0 est présent chez toutes les souches
- les acides 2-OH-25:0 et 2-OH-26:0 sont présents uniquement chez *T. longibrachiatum* et *T. harzianum*
- l'acide 2-OH-22:0 est uniquement retrouvé chez *P. citreonigrum*
- l'acide 2-OH-18:0 est absent uniquement chez les *P. citreonigrum*

*T. longibrachiatum* correspond à la souche produisant le plus d'acides hydroxylés. Quatre 2-OH-AG de 18, 24, 25 et 26 carbones sont identifiés dans les échantillons d'AG des lipides totaux et des PL. C'est au niveau des lipides totaux qu'ils sont les plus importants, représentant plus de 3,5% du mélange d'AG.

Chez *T. harzianum*, les acides 2-OH-18:0, 2-OH-24:0 et 2-OH-25:0 ont été détectés dans les deux types d'AG, excepté le dernier, présent uniquement dans les PL. Ils sont en plus faible proportion (0,5%) par rapport à *T. longibrachiatum* où ils atteignent 3,7 % des AG des lipides totaux. Bien que ne correspondant pas aux AG majoritaires de ces échantillons, il s'agit de la première description de cette famille d'AG chez le genre *Trichoderma*. Il est intéressant de noter que, pour *T. longibrachiatum*, ces AG sont moins fréquemment retrouvés dans la composition des PL que dans celle des lipides totaux.

Les AG hydroxylés, et notamment ceux en position 2, sont connus pour être des constituants communs des glycolipides chez les champignons (Lösel, 1988; Batrakov *et al.*, 2002). Ainsi, ces 2-OH-AG, majoritaires dans les lipides totaux chez les souches de *Trichoderma*, pourraient correspondre (en plus de ceux constituant les PL) aux AG des glycolipides, libérés lors de la saponification des lipides totaux.

Des travaux récents, concernant la différenciation d'espèces d'Armillaires par l'utilisation des profils d'AG, ont révélé la présence de 2-OH-AG à 16, 18 et 22 carbones (Cox *et al.*, 2006). Dans cette étude, le

2-OH-16:0 s'est montré très discriminant pour la séparation des espèces alors que le 2-OH-22:0 correspondait, lui, à l'un des AG majoritaires chez toutes les souches étudiées.

De très nombreux et divers 2-OH-AG, saturés et monoinsaturés, linéaires ou ramifiés ont été identifiés chez les neuf espèces de Basidiomycètes étudiées par Rezanka *et al.* (1999) représentant 4 à 10% des AGT. Les auteurs concluaient, d'ailleurs, que la raison pour laquelle les acides gras hydroxylés avaient été très peu décrits, jusque là chez les champignons supérieurs, n'était pas due au fait qu'ils étaient absents mais plutôt à la difficulté pour les détecter.

Bien que caractéristiques des glycolipides, les 2-OH-AG ont également été décrits chez les PL d'organismes marins comme les éponges (Carballeira *et al.*, 1992; Barnathan *et al.*, 1993; Carballeira *et al.*, 1996).

Chez les deux souches de *Penicillium*, des 2-OH-AG ont également été identifiés, mais uniquement dans les PL, les TG n'étant pas connus pour contenir des AG hydroxylés. Comme pour les souches de *Trichoderma*, il est important de noter que de tels AG ont été très peu décrits à notre connaissance chez le genre *Penicillium*. Il serait intéressant d'étudier les AG au niveau des lipides totaux pour les deux souches de *Penicillium*. En effet, comme nous l'avons remarqué chez les deux souches de *Trichoderma* étudiées, les AG des lipides totaux des souches de *Penicillium* pourraient également contenir des AG hydroxylés.

#### IV-2-3-5- Acides gras conjugués

Plusieurs AGC diinsaturés et triinsaturés ont été observés dans les AG des quatre souches étudiées. Les proportions d'AGC s'étagent sur une large gamme, de 3% pour *P. vermiculatum* jusqu'à plus de 20% chez *P. citreonigrum* dans les TG. Pour les deux champignons du genre *Trichoderma*, les proportions de l'ensemble des AGC varient de 5 à 10%. Les AGC sont plus concentrés dans les lipides totaux et les TG que dans les PL. Chez les quatre souches, les AGC diinsaturés sont prédominants. Les AGC diinsaturés et triinsaturés sont repris et comparés pour les quatre souches (Tableau 2-18 et Tableau 2-19, pages suivantes).

#### IV-2-3-5-1- Acides gras conjugués diinsaturés

Plusieurs AGC diinsaturés ont été mis en évidence chez les 4 souches étudiées (Tableau 2-18).

**Tableau 2-18 : Acides gras conjugués diinsaturés identifiés chez les 4 souches étudiées**

	<i>T. longibrachiatum</i>			<i>T. harzianum</i>		<i>P. vermiculatum</i>		<i>P. citreonigrum</i>	
	LCE	LT	PL	LT	PL	TG	PL	TG	PL
6,8-16:2	16,39	-	-	-	-	-	-	1,30	1,22
4-Me-6,8-16:2 A	16,53	-	-	-	-	-	-	0,76	0,75
Isomère B	16,58	-	-	-	-	-	-	1,06	1,14
Isomère C	16,97	-	-	-	-	-	-	16,42	6,90
cj-17:2	17,25	-	-	-	-	-	-	0,69	0,25
cj-18:2 <sup>1</sup>	18,12	2,13	-	3,27	1,03	1,43	-	1,07	0,44
cj-18:2 <sup>2</sup>	18,20	1,55	0,11	2,99	0,21	1,57	-	0,63	0,11
cj-18:2	18,40	0,25	-	-	-	-	-	0,11	0,49
cj-18:2 <sup>3</sup>	18,54	0,58	0,37	0,33	-	-	-	0,28	-
cj-19:2	19,23	-	-	-	-	-	-	0,10	-
Σ diinsaturés		4,51	0,48	6,59	1,24	3,00	-	22,42	11,31
Σ AGC (diènes + triènes)		4,97	0,67	9,37	1,53	3,00	1,92	22,42	11,64

<sup>1</sup> c9,t11 et/ou t9,c11, <sup>2</sup> t10,c12, <sup>3</sup> c10,c12, par comparaison chromatographique avec les standards commerciaux d'ALC

Les AGC présents chez les 4 souches concernent des isomères conjugués de l'acide linoléique. *P. citreonigrum* se différencie des trois autres souches, d'une part, par la proportion que représentent les AGC diinsaturés dans les TG et les PL (22,4 et 11,6% respectivement), d'autre part par le nombre d'AGC détectés (jusqu'à 10 dans les TG), enfin par la présence d'AGC originaux à 16, 17 et 19 carbones, en plus des deux isomères d'ALC principaux communs aux trois autres souches. En effet, les acides 6,8-16:2, 4-Me-6,8-16:2, cj-17:2, et cj-19:2 spécifiques à cette souche et jamais décrits auparavant, font de ce champignon un microorganisme très original et potentiellement valorisable d'un point de vue biotechnologique et pharmacologique.

En ce qui concerne les isomères d'ALC observés chez les quatre souches, ils représentent 4,5% et 6,6% des AGT chez *T. longibrachiatum* et *T. harzianum* et sont présents à 2,1% et 3% chez *P. vermiculatum* et *P. citreonigrum*. Il est intéressant de noter que, pour les quatre souches, les deux principaux isomères d'ALC correspondent toujours à ceux élus juste après l'EM de l'acide stéarique (LCE = 18,12 et 18,20).

*T. longibrachiatum* et *T. harzianum* correspondent aux deux souches pour lesquelles des isomères d'ALC ont été détectés dans les PL.

Par contre, pour les deux souches de *Penicillium*, il apparaît nettement que les isomères d'ALC sont spécifiquement présents dans les TG et non dans les PL, contrairement à *T. longibrachiatum* et *T. harzianum*.

En comparant les caractéristiques d'éluion des esters des ALC détectés dans les différents échantillons fongiques avec ceux des standards commerciaux, il nous est possible d'émettre des hypothèses sur la position des doubles liaisons et leur configuration.

Ainsi, les ALC majoritaires (LCE = 18,12 et 18,20) chez les quatre souches pourraient correspondre aux isomères  $c9,t11-18:2$  et  $t9,c11-18:2$  co-élués ensemble dans le premier pic suivis de l'isomère  $t10,c12-18:2$ , en se basant sur les caractéristiques d'éluion des ALC commerciaux (cf. Figure 2-15, page 69). De la même façon, l'isomère présentant une LCE de 18,54 et observé chez *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* et *P. citreonigrum* pourrait être identifié comme correspondant à l'isomère  $c10,c12-18:2$ .

Des différences notables sont observées au niveau de l'intensité relative des ions clés entre l'ALC majoritaire (LCE = 18,08) et les isomères commerciaux  $c9,t11/9t,c11-18:2$  co-élués. Il peut être suggéré que ce premier ALC majoritaire, retrouvé chez les quatre souches, pourrait correspondre à l'isomère  $c9,t11-18:2$ . En effet, ce dernier est connu pour être l'isomère d'ALC naturel le plus largement représenté avec l'isomère  $t10,c12-18:2$ . Il est probable que l'isomère  $9t,c11-18:2$ , peu retrouvé dans la nature, ne soit pas présent dans les lipides de ces champignons.

Il est très important de noter qu'il s'agit de la première description de tels acides chez les champignons. En effet, ils étaient jusqu'alors, exclusivement connus pour être d'origine animale.

Nous avons mentionné, d'après l'étude comparative des profils chromatographiques avec des ALC commerciaux, que les deux premiers ALC élués juste après l'EM de l'acide stéarique et détectés chez les quatre souches pourraient correspondre aux isomères  $c9,t11/t9,c11$  et  $t10,c12-18:2$ . Or il est intéressant de préciser que les acides  $c9,t11$  et  $t10,c12-18:2$  sont les deux principaux isomères naturels d'ALC. De plus, il s'agit des isomères d'ALC qui ont et qui continuent de susciter un intérêt, notamment pour leur effet bénéfique sur la santé.

De nombreuses activités biologiques leur sont reconnues : anti-carcinogène, anti-diabétique, anti-obésité, anti-thrombotique, anti-athérogénique ou encore immunomodulateur (Martin et Valeille, 2002). Toutefois, la plupart des travaux qui ont relaté les effets bénéfiques sur la santé de ces isomères d'ALC ont utilisé des mélanges de ces deux isomères ( $c9,t11$  et  $t10,c12-18:2$ ). En effet, les ALC sont produits directement à partir de l'acide linoléique par chauffage en conditions alcalines ou par hydrogénation (Bhattacharya *et al.*, 2006) et les produits commercialisés correspondent la plupart du temps à un mélange 1:1 des isomères  $c9,t11$ - et  $t10,c12-18:2$ . Or il paraît aujourd'hui évident que les isomères  $c9,t11-18:2$  et  $t10,c12-18:2$ , individuellement, peuvent avoir des effets, similaires voire opposés dans différents systèmes biologiques. De nombreuses publications décrivent d'ailleurs des résultats contradictoires sur l'effet de ces isomères d'ALC selon les activités étudiées et les modèles animaux testés (Bhattacharya *et al.*, 2006).

Ainsi certains travaux vont présenter l'isomère  $t10,c12-18:2$  comme l'unique ALC responsable de la diminution des réserves de graisses alors que pour d'autres, c'est l'isomère  $c9,t11-18:2$  qui présente ces effets bénéfiques sur l'organisme. Ainsi par exemple, chez des modèles de souris sujettes à l'athérosclérose (souris privées du gène de l'apoptotéine E), certaines publications montrent que l'isomère  $c9,t11-18:2$  diminue le taux des TG dans le sang, augmente la concentration en « bon » cholestérol (HDL) mais ne diminue pas l'athérosclérose (Nestel *et al.*, 2006). D'autres travaux rapportent que chez un modèle similaire de souris, l'isomère  $t10,c12-18:2$  va favoriser l'athérosclérose contrairement au  $c9,t11-18:2$  qui va plutôt la limiter (Arbonés-Mainar *et al.*, 2006). Enfin, chez le hamster, les deux isomères montrent des effets similaires, ils peuvent limiter le développement de l'athérosclérose sans pour autant que celle-ci soit liée à des changements bénéfiques des profils de lipoprotéines (Mitchell *et al.*, 2005).

Ces observations très variables selon les modèles biologiques testés et les activités biologiques étudiées, montrent la complexité de l'évaluation biologique des AGC.

Néanmoins, l'originalité de notre étude est d'avoir pu mettre en évidence de tels AG chez des champignons. En effet, les AGC, et plus particulièrement les ALC, ont été jusqu'à présent exclusivement décrits à partir de sources animales, notamment les matières grasses du lait, le fromage et la viande des ruminants, où ils sont produits par des processus de biohydrogénation et d'oxydation bactériens (Pariza *et al.*, 2001). Récemment, une étude a montré que des productions efficaces d'ALC pouvaient être obtenues à partir de nombreuses bactéries lactiques (Ogawa *et al.*, 2005).

Une étude plus récente rapporte des productions intéressantes de l'isomère *c10,t12-18:2* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Hornung *et al.*, 2005). Il s'agit, néanmoins, dans cette étude, d'une souche transgénique exprimant le gène bactérien codant l'acide gras polyénoïque-isomérase qui catalyse l'isomérisation d'un système de doubles liaisons interrompues par un groupement méthylène (par exemple 9,12) en son correspondant conjugué. La production de l'ALC n'est donc pas endogène à la levure.

En ce qui concerne la production fongique d'ALC, des études supplémentaires, concernant l'élucidation du mécanisme par lequel ces souches produisent de tels AGC seraient à envisager. Il serait également intéressant de réaliser la séparation des deux principaux ALC identifiés chez ces souches fongiques, notamment *T. harzianum* où ils représentent plus de 6% des AG des lipides totaux. Ceci nous permettrait de réaliser leur étude structurale mais également de procéder à leur évaluation pharmacologique.

#### IV-2-3-5-2- Acides gras conjugués triinsaturés

En plus des ALC, plusieurs isomères d'ALnC ont également été mis en évidence chez les quatre souches (Tableau 2-19).

**Tableau 2-19 : Acides gras conjugués triinsaturés identifiés chez les 4 souches étudiées**

	<i>T. longibrachiatum</i>			<i>T. harzianum</i>		<i>P. vermiculatum</i>		<i>P. citreonigrum</i>	
	LCE	LT	PL	LT	PL	TG	PL	TG	PL
cj-18:3	18,05	-	-	0,39	-	-	-	-	-
cj-18:3	18,33	tr.	-	-	-	-	-	-	-
cj-18:3	18,59	tr.	-	-	-	-	-	-	-
cj-18:3	18,95	-	-	tr.	-	-	-	-	-
cj-18:3	19,03	-	-	0,95	-	-	0,55	-	-
cj-18:3	19,12	-	-	0,60	-	-	0,20	-	-
cj-18:3	19,32	-	-	-	-	-	0,50	-	-
cj-18:3	19,38	-	-	-	-	-	0,67	-	-
cj-18:3	19,49	0,24	-	0,25	0,12	-	-	-	0,16
cj-18:3	19,55	0,22	0,19	0,59	0,17	-	-	-	0,17
Σ triinsaturés		0,46	0,19	2,78	0,29	-	1,92	-	0,33
Σ AGC (diènes + triènes)		5,63	0,67	9,37	1,53	3,00	1,92	22,42	11,64

Au total, 10 isomères d'ALnC ont pu être mis en évidence chez les quatre souches confondues, s'étageant sur une gamme très large de LCE allant de 18,05 à 19,55.

Chez les deux souches du genre *Trichoderma*, les ALnC sont principalement retrouvés dans les lipides totaux. Cinq isomères ont été détectés pour *T. harzianum*, le premier élué juste après l'EM de l'acide stéarique (LCE = 18,05) comme c'était d'ailleurs le cas pour la souche *T. longibrachiatum* lorsque celle-ci était cultivée en milieu liquide (*cf.* Tableau 2-9, page 83). Le dernier isomère est, quant à lui, élué légèrement plus tôt que le 11,14-20:2. Deux isomères pourraient être communs à *T. longibrachiatum*, *T.*

*harzianum* et *P. citreonigrum* (LCE = 19,49 et 19,54) et un à *T. harzianum* et *P. vermiculatum* (LCE = 19,03) en s'appuyant sur leur LCE.

Chez les deux souches de *Penicillium* sp. étudiées, six isomères ont été mis en évidence spécifiquement dans les PL, quatre chez *P. vermiculatum* et deux chez *P. citreonigrum*. Ceci est très intéressant car les ALC ne sont retrouvés, pour leur part, que dans les TG.

Nous avons pu remarquer, en comparant les spectres de masse des différents isomères d'ALnC (EM) que plus ils étaient élués tardivement, plus leur ion moléculaire était abondant. Comme nous l'avons observé pour les AGC diinsaturés, il s'agit également de la première description d'AGC triinsaturés chez des champignons mais également chez des souches d'origine marine.

Il est important de noter qu'aujourd'hui, cinq isomères d'ALnC sont connus et sont principalement d'origine végétale, pouvant atteindre 70% des AG totaux de certaines huiles végétales (Nagao et Yanagita, 2005). Il est possible de suggérer que les champignons que nous avons étudiés jusque là, surtout décrits dans la littérature comme producteurs d'ALA n-3 et d'AL n-6, pourraient produire des isomères additionnels d'ALnC. Leur présence dans les champignons isolés des zones conchylicoles est d'autant plus intéressante que des études sur les activités potentielles des ALnC rapportent qu'ils sont de meilleurs anti-carcinogènes que les ALC (Nagao et Yanagita, 2005).

#### IV-2-3-5-3- Originalité de la souche *Penicillium citreonigrum*

Cette souche montre une originalité dans sa composition lipidique par rapport aux trois autres souches. Alors que les trois autres souches montrent des profils d'AG assez similaires d'un point de vue général, notamment au niveau des AG majoritairement produits, *P. citreonigrum* révèle un profil d'AG complètement inhabituel pour ce genre de champignon avec un AG majoritaire ramifié et conjugué. Cette souche est d'autant plus remarquable qu'elle présente une proportion importante d'AGC à 16, 17, 18 et 19 carbones qui atteignent 21% des AGTG et dont la majorité d'entre eux sont peu conventionnels voire nouveaux (Figure 2-18).

Contrairement aux autres souches, *P. citreonigrum* présente une série étonnante et inattendue d'AG en C<sub>17</sub> représentant 19,5% des AGTG, constat peu commun chez les organismes eucaryotes, comprenant une série de quatre AG ramifiés, le 4-Me-16:1 et trois isomères de position de l'acide 4-Me-6,8-16:2.

Il serait intéressant d'étudier la voie de biosynthèse de cet AG, notamment le processus de fixation du groupe méthyle en position C-4. On pourrait supposer que, comme pour les AG ramifiés en milieu de chaîne, la voie de biosynthèse ferait intervenir la S-adénosylméthionine, utilisée comme donneur de groupements méthyles. Dans ce cas, l'intermédiaire le plus proche du 4-Me-6,8-16:2 serait donc, par la voie de l'adénosylméthionine, l'AG conjugué hypothétique 3,6,8-16:3, non observé ici.

La présence de l'acide 6,8-16:2 dans les TG et les PL, est également intéressante. En effet, cet AG ne diffère des trois isomères de l'acide 4-Me-6,8-16:2 que par l'absence de la ramification en position 4. A notre connaissance, les acides hexadécadiénoïques conjugués ont été très peu décrits dans la littérature. On peut noter, toutefois, la description, en très faible quantité, de l'acide c<sub>10,12</sub>-16:2 dans une étude relative à la biosynthèse d'AGC en position C-10 /C-12 par une  $\Delta$ 11 désaturase bifonctionnelle chez la chenille *Spodoptera littoralis* (Serra et al., 2006).

Contrairement aux acides hexadécadiénoïques conjugués, peu décrits dans la littérature, plusieurs travaux ont concerné les acides nonadécadiénoïques conjugués (ANC), notamment pour leurs propriétés biologiques. En effet, il semblerait que de nombreuses activités leur soient associées, semblables à celles des ALC. Ainsi par exemple, Park et Pariza (2001) ont comparé les effets diététiques des ALC et des ANC sur la souris. Ils ont ainsi montré que ces derniers, au même titre que les ALC, inhibaient l'activité des lipoprotéines lipases des adipocytes cultivés *in vitro* et réduisaient le taux de TG intracellulaires. De plus, au cours de ce travail, ils ont également réalisé une étude comparative d'alimentation en ALC et ANC sur le développement des souris et ont observé que les ANC permettaient une réduction plus importante de la prise de masse grasseuse corporelle au cours du développement des souris que les ALC. Plus récemment, une étude a également montré que les ANC inhibaient l'agrégation plaquettaire chez le cobaye, toujours en comparaison avec les ALC (Li *et al.*, 2006). Ces travaux soulignent l'intérêt que représentent les ANC. Néanmoins, la plupart des travaux publiés sur les ANC ont été réalisés en utilisant des mélanges d'ANC obtenus par synthèse organique et non à partir d'organismes vivants. La mise en évidence d'une source naturelle d'ANC mérite donc d'être soulignée.

Concernant les trois isomères de l'acide 4-Me-6,8-16:2, la présence à la fois d'une ramification et des liaisons conjuguées en font des AG originaux, susceptibles de présenter des activités biologiques intéressantes. La proportion importante de l'un des trois isomères, principalement dans les TG, mais aussi dans les PL nous a permis d'entreprendre et de réussir sa purification afin de réaliser d'une part, son évaluation pharmacologique et d'autre part de préciser sa structure. En effet, pour déterminer au mieux la configuration des doubles liaisons conjuguées, il nous est indispensable de purifier cet AG afin de réaliser d'autres analyses spectrométriques comme la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie infrarouge.

La démarche que nous avons choisie pour cela consiste tout d'abord à réaliser plusieurs étapes d'inclusion à l'urée suivies d'une purification en CLHP-Ag<sup>+</sup>. La combinaison de ces deux étapes s'est révélée gagnante. En effet, l'acide 4-Me-6,8-16:2 a pu être purifié en associant une première étape permettant d'obtenir un mélange simplifié d'AG (par rapport à la composition en AGTG de départ) à une deuxième étape analytique adaptée spécifiquement à la séparation des AG. L'absorbance importante de l'acide 4-Me-6,8-16:2 dans l'ultraviolet (215 nm) et son comportement chromatographique sont des éléments supplémentaires tendant à confirmer l'originalité de sa structure. A partir de 46 mg injectés, 13 mg de cet AG, sous sa forme estérifiée, ont été obtenus, permettant de parfaire et de compléter sa caractérisation structurale mais aussi de procéder à son évaluation pharmacologique.

L'EM de l'acide 4-Me-6,8-16:2 s'est révélé inactif sur les différentes lignées cellulaires cancéreuses testées *in vitro*. Ceci est d'autant plus étonnant qu'il est reconnu que les AG présentent des activités cytotoxiques sur plusieurs lignées cancéreuses. Ainsi, des AGI en *cis* des séries n-3, n-6 et n-9 se sont révélés efficaces, *in vitro*, sur cellules tumorales Meth-A (sarcome induit par le méthylcholanthrène) mais aussi *in vivo*, chez des souris porteuses de la tumeur lorsqu'ils étaient injectés par voie intrapéritonéale (Ramesh et Das, 1998). Une étude intéressante a également été réalisée sur une lignée de myélome murin (Kumar et Das, 1997). L'ALA et l'EPA étaient les plus actifs, induisant une suppression de la prolifération du myélome alors que les AL, GLA, ARA, DHA présentaient des activités moins efficaces. Enfin, nous citerons les travaux de Tranelis *et al.* (2002) qui ont montré que l'acide parinarique conjugué c9,t11,t13,c15-18:4 est préférentiellement cytotoxique sur les cellules gliales malignes de rat par rapport aux astrocytes normaux sur lesquels il l'était peu.

L'activité biologique non observée, ici pour l'EM de l'acide 4-Me-6,8-16:2 est peut-être due au fait qu'il a été testé sous sa forme dérivée d'EM contrairement à la plupart des tests *in vitro* décrits, qui ont été réalisés à partir des formes libres, présentant la fonction carboxylique. Nous allons tester l'acide lui-même,

voire, un sel de cet acide. Toutefois, compte tenu que pour faciliter sa purification en CLHP-Ag<sup>+</sup>, il est convertit en EM, il convient de réaliser son hydrolyse pour le reconvertir en AG libre, en espérant que cette étape n'altère en rien sa structure.

En plus de l'activité cytotoxique, il sera également intéressant de tester l'activité antimicrobienne de cet AG et notamment l'activité antibactérienne. En effet, plusieurs publications ont montré que les AG peuvent présenter des activités antimicrobiennes efficaces sur des microorganismes pathogènes importants tels que *Staphylococcus aureus* (Kabara *et al.*, 1972; Knapp et Melly, 1986), *Helicobacter pylori* (Hazell et Graham, 1990; Sun *et al.*, 2003) ou *Mycobacterium* sp. (Seidel et Taylor, 2004).

Les AG responsables de ces activités sont principalement des AGI à longue chaîne tels que les acides oléique, linoléique, linoléique ou encore arachidonique. Zheng *et al.* (2005) ont montré que les AGI inhibaient la synthèse des AG bactériens, essentielle à la croissance en étudiant la relation structure-activité des AG. Ils ont ainsi pu comparer les activités antibactériennes des AGS (palmitique et stéarique) à celles des AGI (oléique, linoléique et arachidonique). Comme cela avait déjà été décrit auparavant, la présence des insaturations s'est révélée étroitement liée à l'activité antibactérienne. Néanmoins, ils ont également montré que la fonction carboxylique intervient également au niveau de l'activité biologique. En effet, sous forme d'EM, les AGI étaient inactifs. Cette étude confirme donc l'importance de tester notre AG sous sa forme libre.

La plupart des publications relatives au potentiel antibiotique des AG concernent exclusivement des AG linéaires. Très peu de travaux relatent des activités antibiotiques associées à des AG ramifiés mis à part celui de Choudhury et Traquair (1994) concernant les activités antibactériennes et antifongiques associées à l'acide 4-Me-7,11-17:2.

Compte tenu, d'une part, de l'originalité de l'acide 4-Me-6,8-16:2 qui présente à la fois une ramification et une conjugaison, et d'autre part du fort potentiel biologique associé à la présence de systèmes conjugués, nous allons porter nos efforts sur l'évaluation pharmacologique de cet AG, produit majoritairement par la souche *P. citreonigrum* en testant à la fois les formes estérifiée et libre.

## IV-2-4- Mise en évidence de plasmalogènes

Les plasmalogènes ont été mis en évidence dans les PL par la détection de DMA dans le courant ionique total d'EM et notamment à partir des cultures réalisées en milieu liquide. Seules les deux espèces du genre *Trichoderma* ont montré la présence de tels composés. L'analyse CPG/SM a révélé la présence de DMA inhabituels en comparaison avec ce qui est décrit dans la littérature. Toutefois, le peu d'information fournie par les spectres de masses ne nous a pas permis de mieux caractériser la structure des DMA.

Pour cela, il serait intéressant de réaliser une ionisation chimique pour pouvoir observer l'ion moléculaire, et/ou d'analyser les échantillons contenant des DMA en diminuant l'intensité de l'impact électronique en CPG/SM. Ceci pourrait permettre une meilleure caractérisation des ions fragments  $[(CH_3O)_2CH_n]^+$  relatifs aux ruptures des liaisons C-C le long de la chaîne aliphatique.

Les plasmalogènes constituent une large fraction de glycérophospholipides de certains tissus chez les mammifères, comme le cerveau, le système nerveux central, le cœur et les muscles squelettiques (Nagan et Zoeller, 2001). Ils sont également retrouvés dans les tissus aviaires et chez d'autres d'organismes vertébrés et invertébrés.

Chez les microorganismes, ils ont été principalement décrits chez les bactéries anaérobies strictes chez lesquelles ils peuvent constituer jusqu'à la moitié des PL totaux (Goldfine et Panos, 1971; Hagen, 1974; Khuller et Goldfine, 1974; McAllister et De Siervo, 1975). Il s'agit, par contre, de leur première description chez les champignons et ceci est d'autant plus intéressant que ces composés sont connus pour leurs activités anti-oxydantes et leur rôle de médiateurs dans les dynamiques membranaires (Engelmann, 2004). Leurs fonctions biologiques seraient liées à la réactivité chimique particulière de leur fonction éther vinylique.

Un intérêt croissant a d'ailleurs été apporté à l'étude des composés depuis qu'il a été démontré qu'ils étaient impliqués dans de nombreuses maladies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et que de nombreux désordres génétiques étaient observés lorsque la voie de biosynthèse des plasmalogènes était altérée (Nagan et Zoeller, 2001; Brites *et al.*, 2004).

## P2-V- Lipides et acides gras fongiques : conclusion et perspectives

L'enjeu de la présente étude était d'évaluer la richesse des micromycètes marins et principalement ceux isolés des zones conchylicoles et conservés dans la Mycothèque Marine du Laboratoire, en termes de production, de quantité et d'originalité de lipides. A l'issue de ce travail, un bilan des résultats obtenus peut être dressé. Sont également énoncées quelques perspectives découlant du présent travail et confirmant les possibilités de valorisation biotechnologique entrevues.

Tout d'abord en ce qui concerne les procédés de fermentation mis en place pour mener à bien notre projet, les cultures fongiques entreprises principalement en milieu solide, se sont avérées bien adaptées aux objectifs de départ.

La comparaison des productions lipidiques et des compositions en acides gras de *Trichoderma longibrachiatum*, à partir de cultures réalisées en milieux solide et liquide, a conduit à des résultats sensiblement identiques. Ceci vient conforter notre choix initial de nous tourner vers le milieu solide pour procéder à une étude comparative des souches de notre Mycothèque. La fermentation en milieu solide permet, en effet, d'accéder à des quantités de biomasse fongique plus importantes mais également à des proportions plus conséquentes de lipides que celles que l'on peut obtenir en milieu liquide.

Compte tenu de la complexité apparente des compositions des extraits lipidiques obtenus, nous avons concentré nos efforts sur l'étude des acides gras. Cette approche a été menée à plusieurs niveaux, lipides totaux, triglycérides, phospholipides, permettant d'évaluer, séparément, les lipides de structure et de réserve énergétique.

L'étude des lipides totaux permet une évaluation de la composition globale des acides gras. Les triglycérides sont intéressants dans la mesure où ils représentent une part majeure (plus de 90%) des huiles végétales et animales commerciales. Y a-t-il une valorisation possible pour les huiles produites par les champignons et plus particulièrement les micromycètes ? Enfin, l'analyse des phospholipides nous permet d'approfondir nos connaissances sur la structure intime de la membrane cellulaire des champignons étudiés. Elle nous a notamment permis de mettre en évidence, pour la première fois, la présence de plasmalogènes dans les membranes cellulaires chez les souches du genre *Trichoderma*.

Une approche globale a montré que les compositions en acides gras étaient, dans l'ensemble, similaires pour les souches d'origine marine et terrestre. Les principaux rapports comparables sont déjà anciens (une à deux décennies), ce qui explique que les auteurs ne soient pas allés jusqu'au bout des structures moléculaires compte tenu de l'instrumentation analytique. Notre travail a illustré, s'il en était besoin, la puissance de cet outil d'analyse qu'est le couplage CPG/SM pour atteindre et identifier la molécule.

Les souches étudiées ont montré des compositions en acides gras proches, représentées principalement par les acides linoléique, palmitique et oléique. S'agissant de champignons relativement évolués, il est normal que nous n'ayons pas décelé d'acides gras polyinsaturés de la série n-3.

Un des résultats les plus remarquables de la présente étude est la mise en évidence d'acides gras conjugués identifiés pour la première fois chez les champignons. Ces derniers ont été retrouvés chez les

deux genres étudiés et ce, quelque soit le procédé de fermentation. Ils sont présents et dans les lipides de structure et dans les lipides de réserve. Parmi ces acides gras se trouvent, probablement des composés déjà connus, et pour certains même, produits industriellement. Notre étude a montré de plus, la présence d'acides gras conjugués probablement non connus, en particulier les acides gras conjugués C<sub>18:3</sub>. Il semble donc intéressant d'explorer, dans le proche avenir, d'autres souches provenant de la Mycothèque mais aussi de l'environnement naturel marin, pour mieux appréhender le phénomène. Il serait également important de bien évaluer les relations entre conditions de culture et richesse globale en acides gras conjugués afin d'optimiser leur production. Enfin, il serait intéressant de vérifier si ces acides gras conjugués présentent des activités biologiques comparables à ceux produits industriellement.

Dans cette étude, une souche, *P. citreonigrum* s'est particulièrement distinguée en produisant, en plus des acides gras conjugués communs aux autres souches, une série d'acides gras sans précédent. Dans cette série, trois isomères de l'acide 4-méthyl-6,8-hexadécadiénoïque ont été identifiés, dont l'un atteint plus de 15% de la composition en acides gras des triglycérides et 6% de celle des phospholipides. La question est de savoir si d'autres espèces, voisines ou appartenant à des genres voisins, pourraient d'une part, contenir ce type d'acides gras et d'autre part si c'est le cas, dans quelles proportions.

Ce travail a été l'occasion de quelques avancées en matière analytique. Tout d'abord, la mise en évidence de la présence d'acides gras conjugués, principalement par comparaison des comportements chromatographiques, conforte l'opportunité d'utiliser une colonne capillaire apolaire en CPG/SM. Il sera néanmoins envisageable d'étudier le comportement de nos mélanges d'acides gras conjugués sur phases polaires. En ce qui concerne l'acide 4-Me-6,8-16:2, nous avons entrepris sa purification afin de parfaire sa détermination structurale et de poursuivre son évaluation pharmacologique. L'utilisation conjointe de la complexation à l'urée et de la CLHP-Ag<sup>+</sup> s'est avérée fructueuse dans ce cas précis. En effet, cette combinaison de méthodes s'est révélée efficace, permettant d'obtenir cet acide gras purifié à 98%.

Ceci va nous permettre, dans un avenir proche, d'une part de poursuivre l'étude structurale (RMN, infrarouge) de cet acide gras conjugué afin de confirmer les hypothèses de configuration des liaisons conjuguées, mais également de poursuivre son évaluation pharmacologique. Il sera notamment intéressant d'en évaluer les activités antimicrobiennes potentielles mais également de le tester au niveau nutritionnel, en l'intégrant dans des régimes alimentaires.

En conclusion de cette partie concernant l'étude et la valorisation des lipides et acides gras de champignons d'origine marine, les travaux du Laboratoire pourraient tendre à se rapprocher d'un idéal : réussir tout à la fois l'optimisation des productions de biomasse, de lipides et d'acides gras conjugués.

Partie 3

Peptides fongiques : peptaibols  
de *Trichoderma* sp.

## Partie 3- Peptides fongiques : peptaïbols de *Trichoderma* sp.

---

Les peptides forment un groupe chimique particulièrement intéressant chez les champignons. En effet, si ceux-ci produisent des peptides classiques issus du métabolisme primaire, ils biosynthétisent également des peptides lipophiles originaux comme métabolites secondaires.

Parmi ceux-ci, les peptaïbols sont un groupe de molécules présentant des toxicités qui ont pu être mises en évidence en milieu marin lors d'études précédentes. Diverses espèces fongiques en produisent, mais ce sont essentiellement les *Trichoderma* sp. qui en sont l'origine en milieu conchylicole. Cette partie présente l'étude des peptaïbols produits par les deux souches de *Trichoderma* déjà étudiées pour leur production lipidique dans la partie précédente.

## P3-I- Etude bibliographique

### I-1- Les peptaïbols

#### I-1-1- Définition et classification

Les peptaïbols sont de petits peptides linéaires antibiotiques d'origine fongique composés de 5 à 20 acides aminés. Ils ont été largement étudiés pour leurs activités antagonistes contre différents champignons phytopathogènes et utilisés comme agents de biocontrôle (Wiest *et al.*, 2002). Le plus connu d'entre eux, l'alaméthicine, a été isolé en 1967 à partir de cultures de *Trichoderma viride* (Meyer et Reusser, 1967).

Les peptaïbols présentent des caractéristiques structurales originales : une extrémité N-terminale généralement acétylée, une extrémité C-terminale constituée d'un résidu réduit ou amino-alcool (phénylalaninol, valinol, leucinol) et des acides aminés non protéinogènes tels que l'acide  $\alpha$ -amino isobutyrique (Aib) et l'Iva dans leur séquence peptidique. Les principaux acides aminés rencontrés chez les peptaïbols sont référencés Tableau 1-1, page suivante.

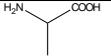
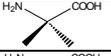
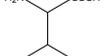
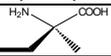
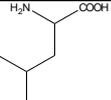
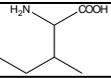
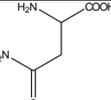
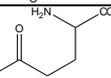
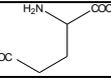
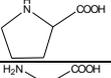
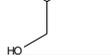
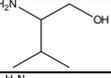
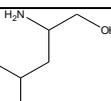
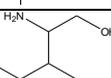
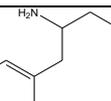
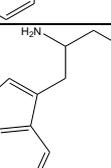
Le nom peptaïbols proposé par Benedetti en 1982 correspond ainsi à la contraction des trois principales caractéristiques de ces composés : **Peptide**, **Aib** et amino-alcool. Les peptaïbols ont tous la particularité de provenir d'une synthèse non ribosomale faisant intervenir un complexe multienzymatique, la peptide synthétase.

La classification des peptaïbols se révèle assez complexe et a beaucoup évolué au fur et à mesure de la découverte de nouvelles séquences. Une première étape de classification a été de regrouper les peptaïbols en tenant compte de la nature et du nombre de résidus les constituant. Ainsi, au cours des années 80, deux grands groupes de peptaïbols étaient considérés :

- Les peptaïbols à longues séquences, les plus connus et les plus représentés, contiennent 17 à 20 acides aminés avec généralement une Pro en position centrale et des Gln à proximité des extrémités. L' amino-alcool est la plupart du temps un phénylalaninol ou un tryptophanol. Les alaméthicines (Meyer et Reusser, 1967; Pandey *et al.*, 1977), trichosporines (Iida *et al.*, 1990) et trichorzianines (Rebuffat *et al.*, 1989) en sont les principaux représentants.
- Les peptaïbols courts ou peptaïbols à courtes séquences sont constitués principalement de 11 à 16 acides aminés et contiennent une plus forte proportion de Pro (2 à 3 résidus). L' amino-alcool est souvent un valinol ou leucinol. Ils présentent des motifs caractéristiques comme Ac-Aib-Asn ou Ac-Aib-Gln en position N-terminale. Les trichorovines (Fujita *et al.*, 1994) et les trichorozines (Iida *et al.*, 1995) font partie de ces peptaïbols.

Un troisième groupe a été défini, comprenant de 7 à 11 résidus et se différenciant surtout par leur extrémité N-terminale, acylée par un acide gras généralement de 8 à 10 carbones. Du fait du caractère lipophile de l'extrémité N-terminale, ces peptides ont été nommés lipopeptaïbols (Auvin-Guette *et al.*, 1992). Les principaux lipopeptaïbols à 11 résidus décrits sont les trichogines (Auvin-Guette *et al.*, 1992). Les trichodécénines sont plus petits et constitués de 7 acides aminés (Fujita *et al.*, 1994).

Tableau 3-1 : Acides aminés entrant dans la composition des peptidols

Acides aminés	Abréviation		Structure	Masse moléculaire du résidu	Protéinogène
	3 lettres	1 lettre			
Glycine	Gly	G		57	Oui
Alanine	Ala	A		71	Oui
Acide $\alpha$ -amino-isobutyrique	Aib	U		85	Non
Valine	Val	V		99	Oui
Isovaline	Iva	J		99	Non
Indéterminé Valine/Isovaline	Vxx	Vx		99	
Leucine	Leu	L		113	Oui
Isoleucine	Ile	I		113	Oui
Indéterminé Leucine/Isoleucine	Lxx	Lx		113	
Asparagine	Asn	N		114	Oui
Glutamine	Gln	Q		128	Oui
Acide glutamique	Glu	E		129	Oui
Proline	Pro	P		97	Oui
Sérine	Ser	S		87	Oui
Valinol	Valol	Vol		102	*
Isovalinol	Ivalol	Jol		102	*
Indéterminé Valinol/Isovalinol	Vxxol	Vxol		102	
Leucinol	Leuol	Lol		116	*
Isoleucinol	Ileol	Iol		116	*
Indéterminé Leucinol/Isoleucinol	Lxxol	Lxol		116	
Phénylalaninol	Pheol	Fol		150	*
Tryptophanol	Trpol	Wol		190	*

\* Amino-alcools dérivant des acides aminés par réduction de la fonction acide

En parallèle à l'isolement des peptaïbols, Brückner (1991) introduit le terme « peptaïbiotiques » regroupant tous les **peptides** riches en résidus **Aib**, à propriétés **antibiotiques** et ne présentant pas d'amino-alcool en position C-terminale. D'après cette définition, les trois classes de peptaïbols (longs, courts, lipopeptaïbols) ne sont alors pas considérées comme des peptaïbiotiques, tous ces peptides possédant un amino-alcool à l'extrémité C-terminale.

En 2003, la définition des peptaïbols/peptaïbiotiques est révisée par Degenkolb qui suggère que les peptaïbols doivent être considérés comme un sous-groupe des peptaïbiotiques en précisant les caractéristiques des peptaïbols et des peptaïbiotiques.

La définition des peptaïbols reste inchangée, mais les auteurs insistent sur les caractéristiques spécifiques des peptaïbols. Un peptide ne peut être considéré comme peptaïbol que si :

- il est **linéaire**
- son poids moléculaire est compris entre 500 et 2000 Da
- il présente une **forte proportion d'Aib** et des **acides aminés non protéinogènes** (Aib, Iva).
- il possède une extrémité N-terminale **acétylée** alors que l'extrémité C-terminale correspond à la forme **réduite** d'un acide aminé : **amino-alcool**

D'après Degenkolb *et al.*, (2003) seuls les peptaïbols longs et les peptaïbols courts répondent à cette définition. Les lipopeptaïbols, eux, ne peuvent plus être considérés comme des peptaïbols du fait de leur extrémité N-terminale acylée par un acide gras et non pas acétylée.

Par contre, la définition des peptaïbiotiques est élargie par rapport à la première définition proposée par Brückner et regroupe alors tous les peptides dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Peptides **linéaires** constitués de 5 à 20 AA.
- Poids moléculaires compris entre 500 et 2200 Da
- Peptides contenant une **forte proportion d'Aib** et la présence d'acides aminés non protéinogènes qui peuvent être **lipoaminés**
- Extrémité N-terminale **acylée**
- Résidu C-terminal peut correspondre à un amino-alcool **simple** ou **2-méthoxy substitué**, une **amine**, un **amide**, une **diketopipérazine**, un **polyol** ou un **acide aminé libre**

Aujourd'hui, les auteurs s'accordent à considérer une grande famille de peptides antibiotiques, les peptaïbiotiques, constituée de trois sous-groupes principaux : les **lipopeptaïbols**, les **lipoaminopeptides** et les **peptaïbols**, ces derniers correspondant au sous-groupe majoritaire (Degenkolb *et al.*, 2006a; Degenkolb *et al.*, 2006b). Les caractéristiques principales des peptaïbiotiques sont résumées Tableau 3-2.

**Tableau 3-2 : Caractéristiques des sous-groupes de peptaïbiotiques**

Peptaïbiotiques	Caractéristiques
Peptaïbols	Résidu N-terminal acétylé, présence d'acides aminés non protéinogènes, résidu C-terminal réduit
Lipopeptaïbols	Résidu N-terminal acylé par un acide gras, présence d'acides aminés non protéinogènes, résidu C-terminal réduit
Lipoaminopeptides	Résidu N-terminal acylé par un acide gras ou un acide gras ramifié, présence d'acides aminés non protéinogènes et d'acides lipoaminés, résidu C-terminal libre ou substitué, réduit ou non
Peptaïbiotiques non classés	Peptaïbiotiques ne rentrant pas dans les trois catégories précédentes

Chugh et Wallace (2001) ont proposé un autre modèle de classification complémentaire en regroupant les peptaïbols et peptaïbiotiques en 9 sous familles basées cette fois-ci sur l'alignement des séquences des AA. Ainsi, 317 séquences ont été répertoriées et classées dans une banque de données, la « Peptaibol Database » ([www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/welcome](http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/welcome)) (Whitmore *et al.*, 2003; Whitmore et Wallace, 2004). Néanmoins, cette classification reste aujourd'hui incomplète et de nombreuses séquences ne sont pas référencées.

## I-1-2- Biosynthèse

La présence dans les séquences des peptaïbols d'acides aminés non protéinogènes tels que l'Aib ou l'Iva a très vite laissé penser que les peptaïbols provenaient d'une biosynthèse polyenzymatique non ribosomale, comme c'est le cas pour de nombreux peptides microbiens antibiotiques tels que la gramicidine (Kurahashi *et al.*, 1982), la ciclosporine (Billich et Zocher, 1987) ou l'isopénicilline (Kurzatkowski *et al.*, 1991).

Pour la synthèse des peptaïbols, les complexes enzymatiques font intervenir des peptides synthétases non ribosomales (NRPS, *Non Ribosomal Peptide Synthetases*) qui biosynthétisent les peptaïbols à partir d'une gamme très large de précurseurs.

Les peptides synthétases non ribosomales ont une structure modulaire où chaque module est une sous-unité semi-autonome qui reconnaît, active et modifie un résidu du peptide final (Marahiel *et al.*, 1997). Une peptide synthétase est ainsi constituée d'une répétition de 10 à 22 modules où chaque module contient trois domaines distincts successifs d'adénylation (A), de thiolation (T) et de condensation (C). Ces trois domaines jouent respectivement le rôle de reconnaissance, d'activation et d'incorporation d'un acide aminé dans la séquence peptidique.

Il est aujourd'hui établi que le nombre de modules constituant la peptide synthétase correspond au nombre de résidus des peptaïbols produits. Les modules des deux extrémités sont complétés d'enzymes spécifiques qui vont permettre chez les peptaïbols d'acétyler le résidu N-terminal et de réduire le dernier AA, à l'extrémité C-terminale.

En 2003, une peptide synthétase intervenant dans la biosynthèse de l'ampullosporine a été isolée chez *Sepedonium ampullosporium* (Reiber *et al.*, 2003). Les auteurs ont proposé un modèle de biosynthèse montrant l'incorporation des 15 acides aminés par chacun des 15 modules de la peptide synthétase, de l'extrémité N-terminale acétylée à l'extrémité C-terminale hydroxylée.

Un an plus tôt, le premier gène codant une peptide synthétase, nommé *tex1*, a été cloné chez l'espèce *Trichoderma virens* (Wiest *et al.*, 2002). Cette souche s'est avérée produire des peptaïbols à 11, 14 et 18 résidus. L'étude montra que l'expression de *tex1* était en rapport étroit avec la biosynthèse de tous les peptaïbols identifiés chez *T. virens*. En effet, des mutations réalisées sur ce gène, en modifiant la séquence de gène *tex 1* au niveau du module 11 entraînait une inhibition de la production de tous les peptaïbols. Ainsi, selon les auteurs, les différents peptaïbols identifiés, présents en mélange de séquences analogues ou microhétérogènes étaient produits par une seule peptide synthétase, constituée de 18 modules, dont leur organisation reflétait la taille et l'alignement des séquences produites de peptaïbols, c'est-à-dire des peptaïbols à 11, 14 et 18 résidus.

Des travaux plus récents vont à l'encontre de la présence d'une unique peptide synthétase, responsable de la biosynthèse de toute une gamme de peptaïbols dont le nombre maximal de modules correspondrait aux peptaïbols les plus longs. Ainsi Wei *et al.* (2005) ont réétudié l'espèce *Trichoderma*

*virrens* en travaillant sur une souche d'importance commerciale. Cette souche s'est avérée posséder le même profil de peptaïbols que celle étudiée par l'équipe de Wiest. Les auteurs ont procédé à des mutations sur le gène homologue de *tex1* et il a clairement été démontré que les mutations interrompaient uniquement la production des peptaïbols à 18 résidus sans agir sur celle des peptaïbols à 11 et 14 résidus. Les auteurs proposent alors l'existence d'au moins un autre gène que *tex1* chez *T. virrens* responsable de la biosynthèse des peptaïbols courts.

Les peptaïbols se présentent souvent en mélanges microhétérogènes où certains résidus sont constants par rapport à d'autres plus variables. Il semblerait que cette composition puisse provenir de la spécificité plus ou moins grande des différents modules des peptides synthétases intervenant dans la biosynthèse des peptaïbols (Rebuffat *et al.*, 2000).

### I-1-3- Organismes producteurs

Les peptaïbols sont produits principalement par des champignons filamenteux microscopiques saprotrophes ou parasites de plantes. La classification des genres de champignons principalement décrits comme producteurs de peptaïbols est présentée Tableau 3-3. Sont également indiquées les formes anamorphes et téléomorphes correspondant aux genres producteurs.

**Tableau 3-3 : Principaux champignons producteurs de peptaïbols**

Anamorphes	Téломorphes	Famille	Ordre	Classe	Sous- embranchement	Embranchement
<i>Clonostachys</i>	-	Bionectriaceae				
<i>Gliocladium</i> <i>Trichoderma</i> <i>Sepedonium</i> -	<i>Sphaerostilbella</i> <i>Hypocrea</i> <i>Hypomyces</i> <i>Apiocrea</i>	Hypocreaceae	Hypocreales	Sordariomycetidae	Ascomycètes	
<i>Acremonium</i> -	<i>Emericellopsis</i> <i>Stilbella</i>	Incertae sedis				Eumycota
<i>Verticimonosporum</i>	-	Incertae sedis	Incertae sedis	Incertae sedis		
- -	<i>Boletus</i> <i>Tylopilus</i>	Boletaceae	Boletales	Agaricomycetidae	Basidiomycètes	

La majorité des champignons produisant des peptaïbols appartiennent au sous-embranchement des Ascomycètes. Deux études ont, toutefois, décrit l'isolement et l'identification de peptaïbols chez des champignons macroscopiques appartenant aux genres *Boletus* (Lee *et al.*, 1999a) et *Tylopilus* (Lee *et al.*, 1999b).

Degenkolb *et al.* (2003) émettent un doute quant à l'origine de ces peptaïbols. En effet, ils considèrent que les bolétusines et tylopeptines, identifiées respectivement dans les basidiospores de *Boletus* ssp. et *Tylopilus neofelleus*, doivent probablement provenir, non par de ces champignons, mais d'une contamination des basidiospores par des champignons parasites tels que *Sepedonium* sp. Ce genre de champignons est connu, d'une part pour produire des peptaïbols similaires et d'autre part, pour infecter les basidiospores et les ascospores des champignons supérieurs. Ainsi, ils supposent que le jeune stade d'infection n'aurait pas permis aux auteurs de reconnaître macroscopiquement la présence du champignon parasite, entraînant alors l'extraction de ses peptaïbols en même temps que le contenu des basidiospores.

En ce qui concerne les Ascomycètes, tous les genres appartiennent à la classe des Sordariomycetidae et à l'ordre des Hypocreales, excepté le genre *Verticimiosporum* (Kumazawa *et al.*, 1994) pour lequel une incertitude demeure au niveau de sa classification pour ses classe, ordre et famille.

Chez les Hypocreales, les champignons les plus représentés pour la production de peptaïbols correspondent à la famille des Hypocreaceae, chez laquelle sont retrouvés des champignons présents à la fois sous leurs formes anamorphes et téléomorphes, excepté le genre *Apiocrea*. C'est le cas des couples de genres *Gliocladium* / *Sphaerostilbella*, *Trichoderma* / *Hypocrea* et *Sepedonium* / *Hypomyces*.

Une incertitude taxonomique demeure à l'heure actuelle sur la position des genres *Acremonium* et sa forme téléomorphe *Emericellopsis* ainsi que la forme téléomorphe *Stilbella*, bien qu'il s'agisse de champignons très proches taxonomiquement de la famille des Hypocreaceae.

Le genre *Clonostachys* se distingue dans l'ordre des *Hypocreales*, correspondant au seul genre appartenant à la famille des Bionectriaceae décrit comme producteur de peptaïbols.

## I-2- Les peptaïbols des genres *Trichoderma* */ Hypocrea*

Les champignons des genres *Trichoderma/Hypocrea* sont les principaux producteurs de peptaïbols. Plus de 300 séquences différentes ont ainsi été décrites à partir de ces champignons. Le Tableau 3-4 (page suivante) regroupe pour chaque espèce les familles de peptaïbols décrites à ce jour. Sont également mentionnés les autres peptaïbiotiques rencontrés chez ces deux genres.

Le plus grand nombre de séquences a été décrit à partir des espèces *T. viride* (107), *T. brevicompactum* (68) et *T. harzianum* (54). S'ensuivent les espèces *T. Polysporum* (28), *T. longibrachiatum* et *T. cf. strigosum* (18) et *Hypocrea peltata* (15).

Les peptaïbols courts représentent 34% des séquences décrites de peptaïbols. Huit familles de peptaïbols ont été décrites chez six espèces de *Trichoderma* et chez *Hypocrea muroiana* : trichorovines, trichocryptines, trichobrévines, harzianines, trichorozines, trichobrachines, hypomurocines et trichofumines. Parmi elles, les trichorovines (*T. viride*), les trichocryptines et trichobrévines (*T. brevicompactum*) présentent le plus grand nombre de séquences microhétérogènes.

Les peptaïbols longs, majoritaires (66%), ont été isolés de toutes les espèces étudiées jusqu'à aujourd'hui excepté *T. brevicompactum*, *T. pseudokoningii* et *T. pubescens*. Vingt-deux familles de peptaïbols longs ont été décrites, correspondant à un total de 212 séquences. Les alaméthicales représentent les peptaïbols longs les plus importants avec 30 séquences microhétérogènes décrites. En effet, depuis leur découverte par Meyer et Reusser en 1967, les différentes séquences d'alaméthicaline ont été reconsidérées par Kirschbaum *et al.* en 2003 qui en dénombraient 23, réparties en deux groupes : les alaméthicales F30 et F50. Plus récemment, sept nouvelles séquences ont été découvertes par Psurek *et al.* (2006).

En plus des peptaïbols, d'autres peptaïbiotiques (lipopeptaïbols et lipoaminopeptides) ont été décrits chez le genre *Trichoderma*.

En ce qui concerne les lipopeptaïbols, cinq familles, correspondant à un total de 23 séquences, ont été isolées des espèces *T. longibrachiatum*, *T. cf. strigosum*, *T. koningii* et *T. pubescens*. Les lipostrigocines sont les lipopeptaïbols les plus importants, représentant un total de 15 séquences microhétérogènes. Les lipoaminopeptides sont également représentés chez les *Trichoderma* sp. par deux familles : les trichoférines et les trichopolynes. Il s'agit de peptides constitués de 10 résidus et qui ont la particularité de présenter à l'extrémité N-terminale une Pro acylée par un acide gras, un acide lipoaminé en position 2 et un amino-alcool substitué à l'extrémité C-terminale.

Enfin, deux autres familles, les trichocompactines et les pseudokonines appartiennent aux peptaïbiotiques non classés car ne correspondant pas aux trois principaux sous-groupes de peptaïbiotiques. Les premiers sont des petits peptides de huit résidus, acétylés à l'extrémité N-terminale, constitués de deux Aib (positions 1 et 5) mais présentant un acide aminé libre à l'extrémité C-terminale. Dix-sept séquences microhétérogènes ont été décrites chez *T. brevicompactum* et une chez *T. stromaticum*. Les seconds, les pseudokonines KL III et KL VI, présentent un type de séquence similaire aux peptaïbols à 11 résidus mais ne possèdent respectivement que 10 et 8 résidus et sont dépourvus d' amino-alcool. La pseudokonine KL III présente une Pro-NH<sub>2</sub> à l'extrémité C-terminale (position 10) alors que pour la pseudokonine KL VI, une cyclisation intramoléculaire entre les résidus Aib-Pro en position 9-10 est survenue, provoquant la formation d'un groupement hydroxy-cétopipérazine.

**Tableau 3-4 : Peptaïbols et autres peptaïbiotiques isolés des genres *Trichoderma* / *Hypocrea* (classés par nombre de séquences décrites par espèce)**

Espèces (Nb total de séquences)	Nom des familles	PC*	PL	LP	AP	PB	Références
<i>T. viride</i> (107)	Trichovirines	25					(Wada <i>et al.</i> , 1995)
	Alaméthiicines		30				(Kirschbaum <i>et al.</i> , 2003; Psurek <i>et al.</i> , 2006)
	Suzukacillines		15				(Krause <i>et al.</i> , 2006)
	Trichotoxines		13				(Brückner et Przybylski, 1984a)
	Trichorovines		12				(Jaworski <i>et al.</i> , 1999)
	Trichocellines		10				(Wada <i>et al.</i> , 1994)
	Trichodécénines			2			(Fujita <i>et al.</i> , 1994)
<i>T. brevicompactum</i> (68)	Trichocryptines	26					(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006b)
	Trichobrévines	19					
	Trichoférines				6		
	Trichocompactines					17	
<i>T. harzianum</i> (54)	Harzianines	14					(Rebuffat <i>et al.</i> , 1995; Augeven-Bour <i>et al.</i> , 1997)
	Trichorozines	4					(Iida <i>et al.</i> , 1995)
	Trichorzines		17				(Goulard <i>et al.</i> , 1995; Leclerc <i>et al.</i> , 1998a)
	Trichokindines		11				(Iida <i>et al.</i> , 1994)
	Trichorzianines		8				(Rebuffat <i>et al.</i> , 1989)
<i>T. polysporum</i> (28)	Trichosporines		19				(Iida <i>et al.</i> , 1993)
	Polysporines		4				(New <i>et al.</i> , 1996)
	Trichopolynes				5		(Fuji <i>et al.</i> , 1978; Iida <i>et al.</i> , 1999)
<i>T. longibrachiatum</i> (18)	Trichobrachines	8					(Mohamed-Benkada <i>et al.</i> , 2006)
	Longibrachines		6				(Leclerc <i>et al.</i> , 2001)
	Tricholongines		2				(Rebuffat <i>et al.</i> , 1991)
	Trichogine			1			(Auvin-Guette <i>et al.</i> , 1992)
<i>T. cf. strigosum</i> (18)	Tricholongines		3				(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006a)
	Lipostrigocines			15			
<i>H. peltata</i> (15)	Hypelcines		15				(Fujita <i>et al.</i> , 1984; Matsuura <i>et al.</i> , 1994)
<i>T. koningii</i> (13)	Trichokonines		10				(Huang <i>et al.</i> , 1995)
	Trikoningines		1	2			(Auvin-Guette <i>et al.</i> , 1993)
<i>H. muroiana</i> (12)	Hypomurocines	6	6				(Becker <i>et al.</i> , 1997)
<i>T. atroviride</i> (7)	Neatroviridines		4				(Oh <i>et al.</i> , 2002; Oh <i>et al.</i> , 2005)
	Atroviridines		3				(Oh <i>et al.</i> , 2000)
<i>T. stromaticum</i> (6)	Trichostromaticines		5				(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006a)
	Trichocompactines					1	
<i>T. ssp.</i> (6)	Trichofumines	4					(Berg <i>et al.</i> , 2003)
	Peptaivirines		2				(Yun <i>et al.</i> , 2000)
<i>T. saturnisporum</i> (5)	Saturnisporines		4				(Rebuffat <i>et al.</i> , 1993)
	Paracelsine E		1				(Ritieni <i>et al.</i> , 1995)
<i>T. reesei</i> (4)	Paracelsines		4				(Brückner et Przybylski, 1984a)
<i>T. pubescens</i> (4)	Tricholongine		1				(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006a)
	Lipopubescines			3			
<i>T. pseudokoningii</i> (3)	Harzianine HK	1					(Rebuffat <i>et al.</i> , 1996)
	Pseudokonines					2	(Rebuffat <i>et al.</i> , 2000)
<i>T. virens</i> (3)	Trichorzines TVB		3				(Wiest <i>et al.</i> , 2002)
<i>T. strigosum</i> (2)	Trichostrigocines		2				(Degenkolb <i>et al.</i> , 2006a)
<i>T. sp.</i> (1)	Trichotoxine VI		1				(Sabareesh et Balaram, 2006)
Total		<b>107</b>	<b>212</b>	23	11	20	

\* PC : peptaïbols courts, PL : peptaïbols longs, LP : lipopeptaïbols, AP : Lipoaminopeptides, PB : autres peptaïbiotiques  
( ) Nombre de séquences observées pour chaque espèce

Nous allons maintenant focaliser notre attention sur les spécificités des peptaïbols à courtes et longues séquences produits par les champignons des genres *Trichoderma/Hypocrea*.

## I-2-1- Peptaïbols à courtes séquences (11-14 résidus)

D'une manière générale, les peptaïbols courts correspondent à des peptides comprenant de 11 à 16 résidus. Chez les genres *Trichoderma* / *Hypocrea*, aucun peptaïbol de 15 ou 16 résidus n'a été décrit. Quatre familles de peptaïbols courts se distinguent en fonction du nombre de résidus : 11, 12, 13 et 14). Quelque soit le nombre de résidus, les peptaïbols courts isolés des *Trichoderma* sp. présentent des caractéristiques communes comme la présence d'au moins deux Pro et une extrémité C-terminale constituée généralement de Valol, Leuol ou Ileol. Il est possible, pour les différentes familles de peptaïbols courts décrites chez les *Trichoderma* sp., de mettre en évidence les caractéristiques et des alignements de séquences.

Remarque : du fait de la microhétérogénéité des peptaïbols, plusieurs séquences similaires peuvent être décrites pour une même famille de peptaïbols. Ce phénomène, comme nous l'avons décrit, est provoqué par la présence de positions pouvant présenter différents résidus dits « variables », contrairement à d'autres contenant toujours les mêmes résidus. Ainsi, pour chaque famille de peptaïbols, seront présentés, dans un tableau, la séquence de base et, le cas échéant, les différents résidus variables décrits aux positions concernées. Afin de faciliter la compréhension, un exemple du type de tableau que nous utiliserons par la suite est présenté ci-dessous avec le cas des trichorovines :

Peptaïbols ou famille de peptaïbols	Position											Masses moléculaires (Da)				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11					
Trichorovines	Ac	U	N	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1146,5	1160,5	1174,5	1188,5
			Q	V	V			(L)	(L)			Vol				
			(I)	(I)								lol				
												Lol				

Séquence de base

Positions présentant des résidus variables

La séquence de base AcUNLxLxUPLxLxUPLxol est indiquée sur la première ligne. D'autres séquences sont décrites chez cette famille en fonction des résidus présents aux positions variables 2, 3, 4, 7, 8 et 11. Les résidus indiqués entre parenthèses correspondent aux résidus peu fréquents. Les différentes combinaisons de séquences possibles chez les trichorovines vont présenter des masses moléculaires s'échelonnant entre 1146 et 1188 Da.

## I-2-1-1- Peptaïbols à 11 résidus

Les peptaïbols à 11 résidus correspondent au groupe de peptaïbols à courtes séquences le plus varié et le plus important. Ils sont répertoriés Tableau 3-5.

**Tableau 3-5 : Caractéristiques et variations structurales des peptaïbols à 11 résidus**

Peptaïbols ou famille de peptaïbols	Position											Masses moléculaires (Da)					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11						
Harzianine HB-I	Ac	U	N	L	I	U	P	J	L	U	P	Lol	1160,5				
Harzianine HK-VI				I				L					1174,5				
Trichorovines	Ac	U	N	Lx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1146,5	1160,5	1174,5	1188,5	
			Q	V	V			(L)	(L)			Vol					
			(I)	(I)								lol					
												Lol					
Trichorozines	Ac	U	N	I	L	U	P	I	L	U	P	Vol	1160,5	1174,5	1188,5		
			Q									Lol					
Trichobrachines A	Ac	U	N	L	V	U	P	L	L	U	P	Vol	1146,5				
				V	L			V	U			Lol					
Trichobrachines B	Ac	U	N	V	L	U	P	V	U	V	P	Lol	1146,5				
			L	V				L				Vol					
Hypomurocines	Ac	U	Q	V	V	U	P	L	L	U	P	Lol	1160,5	1174,5	1188,5		
		(J)	I	L				I									
				(I)													
Trichofumines A/B	Ac	V	Q	L	V	U	P	L	L	U	P	Lol	1188,5				
				L									1202,6				
Trichobrévines A	Ac	U	A	Vx	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1075,4	1089,4	1103,4	1117,5	
			U	Lx								Vxol					
												Uol					
												Aol					
Trichobrévines B	Ac	U	S	Vx	Lx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1105,5	1119,5	1133,5		
				Vx								Vxol					
				U								Uol					
Trichocryptines A	Ac	Lx	U	P	Vx	U	P	Lx	Lx	U	P	Lxol	1101,4	1115,4	1129,5	1143,5	1157,5
		(Vx)			(Lx)(Vx)			U	Vx			Vxol					

Au vu de ce Tableau, nous pouvons proposer un modèle de séquence pour tous les peptaïbols à 11 résidus (Figure 3-1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Ac</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>U</b>	<b>P</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>U</b>	<b>P</b>	<b>xol</b>
	U	N	Lx	Lx			Lx	Lx			Lxol
	(Vx)	Q	Vx	Vx			(Vx)	(Vx)			Vxol
	(Lx)	A	(U)				(U)	(U)			(Uol)
		S	(P)								(Aol)
		(U)									

**Figure 3-1 : Modèle de séquence-type des peptaïbols à 11 résidus**

Selon ce modèle, les séquences présentent des motifs constants (en gras) et d'autres plus ou moins variables. Ainsi, tous les peptaïbols à 11 résidus sont caractérisés par la présence de deux segments Aib-Pro constants en position 5-6 et 9-10. Les positions 2, 3, 4 et 11 sont variables. Quatre résidus sont principalement rencontrés en position 2 : Ans, Gln, Ala et Ser. Les positions 3 et 4 sont caractérisées par la présence de Vxx et Lxx, comme en position 11 (Vxxol et Lxxol majoritairement

rencontrés). Les positions 1, 7 et 8 sont elles moins variables. Généralement un Aib est acétylé en position 1 et les résidus Lxx prédominent aux positions 7-8.

Les peptaïbols à 11 résidus sont majoritairement constitués de deux Pro. Les trichocryptines A (*T. brevicompactum*) sont une exception, il s'agit des seuls peptaïbols à 11 résidus caractérisés par la présence de trois Pro.

Deux familles de peptaïbols présentent des originalités. La première, celle des trichobrachines A/B a été précédemment isolée au Laboratoire de *T. longibrachiatum* MMS 151 (Mohamed-Benkada *et al.*, 2006). Deux groupes ont été décrits : les trichobrachines A présentant une séquence caractéristique des peptaïbols courts avec le motif constant Aib<sub>9</sub>-Pro<sub>10</sub> et les trichobrachines B montrant une originalité de séquence au niveau des positions 8-9 avec une inversion entre les résidus 'Aib et Val (motifs Val<sub>9</sub>-Pro<sub>10</sub> au lieu de Aib<sub>9</sub>-Pro<sub>10</sub>). La deuxième famille correspond à celle des trichobrévines, isolées de *T. brevicompactum*. Certaines séquences ont la particularité de présenter des résidus réduits en position 11 jamais décrits auparavant : Aibol et Alaol (Degenkolb *et al.*, 2006b).

### I-2-1-2- Peptaïbols à 12 résidus

Les trichocryptines B sont les seuls peptaïbols à 12 résidus décrits chez les *Trichoderma*. Elles ont été isolées à partir d'une souche de *Trichoderma brevicompactum* Complex et 14 séquences ont été publiées récemment par Degenkolb *et al.* (2006b) (Tableau 3-6).

**Tableau 3-6 : Caractéristiques et variations structurales des peptaïbols à 12 résidus**

Famille de peptaïbols	Position												Masses moléculaires (Da)						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1186,4	1200,4	1214,5	1228,5	1242,5	1256,6	
Trichocryptines B	Ac	Lx	U	P	Vx	Vx	U	P	U	Lx	U	P	Lxol						
		(Vx)			Lx		Lx	Vx				Vxol							
							(Vx)	(U)											

Les trichocryptines B divergent des trichocryptines A (11 résidus) par la présence de Vxx en position 5. Trois motifs Aib-Pro sont rencontrés aux positions 2-3, 6-7 et 10-11. Le résidu acétylé en position 1 correspond le plus souvent à des résidus Lxx, ce qui n'est pas représentatif de la majorité des peptaïbols courts. Les séquences décrites varient selon les acides aminés rencontrés aux positions 5, 8, 9 et 12 (amino-alcool).

### I-2-1-3- Peptaïbols à 13 résidus

Deux séquences de peptaïbols courts à 13 résidus ont été décrites à partir d'une souche non identifiée de *Trichoderma* sp. (Berg *et al.*, 2003) et sont présentées Tableau 3-7.

**Tableau 3-7 : Caractéristiques et variations structurales des peptaïbols à 13 résidus**

Famille de peptaïbols	Position													Masses moléculaires (Da)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Trichofumines C/D	Ac	V	Q	V	U	Q	L	L	P	L	U	P	LoI	1421,7
				L										1435,7

L'alignement des séquences des trichofumines C et D est peu similaire à celui de leurs homologues à 11 résidus (trichofumines A et B). Les segments similaires entre trichofumines A/B et C/D

correspondent aux quatre résidus de l'extrémité N-terminale Ac-Val-Gln-Val-U et aux trois de l'extrémité C-terminale Aib-Pro-Leuol. Le segment central des trichofumines C/D est très différent de celui des trichofumines A/B : présence de deux Gln en position 5 et 6 et un seul motif Aib-Pro est observé.

La proportion importante de Gln observée ici est rare chez les peptaïbols à courtes séquences. Cette caractéristique est d'ailleurs plus spécifique des peptaïbols à longues séquences pour lesquels deux Gln sont souvent décrits successivement à proximité de l'extrémité C-terminale. Le résidu acétylé à l'extrémité N-terminale correspond à une Val, contrairement à l'Aib plus généralement rencontré chez les peptaïbols. L'amino-alcool correspond à un Leuol comme c'est souvent le cas chez les peptaïbols à courtes séquences.

### I-2-1-4- Peptaïbols à 14 résidus

Les seuls peptaïbols à 14 résidus décrits à ce jour chez les genres *Trichoderma/Hypocrea* concernent les harzianines HC isolées de *Trichoderma harzianum* (Rebuffat *et al.*, 1995) (Tableau 3-8).

**Tableau 3-8 : Caractéristiques et variations structurales des peptaïbols à 14 résidus**

Famille de peptaïbols	Position														Masses moléculaires (Da)				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14					
Harzianines HC	Ac	U	N	L	U	P	A	V	U	P	J	L	U	P	Lol	1385,5	1399,5	1413,6	1427,6
			Q				I			U									
Harzianines HC	Ac	U	N	L	U	P	S	I	U	P	U	L	U	P	Lol	1401,5	1415,5	1429,6	1443,6
			(Q)				(V)			J				(Vol)					

Ces peptaïbols sont caractérisés par une proportion non négligeable d'Aib. Une distinction en deux sous-familles peut être proposée en fonction du résidu rencontré en position 6 : Ala ou Ser. Cette distinction réalisée, des homologies de séquences peuvent être observées. Ainsi, des parties constantes correspondent à l'Aib acétylé en position 1, les fragments Leu<sub>3</sub>-Aib<sub>4</sub>-Pro<sub>5</sub>, Aib<sub>8</sub>-Pro<sub>9</sub> et Leu<sub>11</sub>-Aib<sub>12</sub>-Pro<sub>13</sub>. Les parties variables concernent les positions 2 (Asn/Gln), 6 (Ala/Ser), 7 (Val/Leu), 10 (Aib/Iva) et 14 (Leuol/Valol). En ce qui concerne l'extrémité C-terminale, la plupart des séquences décrites ici présentent un Leucinol. Les harzianines HC sont les seuls peptaïbols à courtes séquences avec les trichobrévines contenant Ala et Ser. Elles ont également en commun avec les trichocryptines la présence de trois résidus Pro dans leurs séquences.

### I-2-1-5- Bilan

Pour conclure sur les spécificités des séquences des peptaïbols courts, les modèles définissant les différentes familles (11, 12, 13 et 14 résidus) de peptaïbols sont présentés ensemble et alignés à partir de l'extrémité C-terminale (Figure 3-2).

11 résidus	Ac	x	x	x	x	U	P	x	x	U	P	xol			
	Ac	x	U	P	x	U	P	x	x	U	P	xol			
12 résidus	Ac	x	U	P	x	x	U	P	x	x	U	P	xol		
14 résidus	Ac	x	x	x	U	P	x	x	U	P	x	x	U	P	xol
13 résidus	Ac	x	x	x	x	x	x	x	x	P	x	U	P	xol	

**Figure 3-2 : Caractéristiques générales des peptaïbols à séquences courtes**

Cette illustration permet de mettre en évidence les homologues de séquences entre les peptaïbols à 11, 12 et 14 résidus. En effet, ces peptaïbols présentent tous, dans leur moitié C-terminale, un alignement des deux motifs Aib-Pro séparés par deux résidus. Les peptaïbols à 13 résidus sont très différents avec seulement le motif Aib-Pro lié à l'amino-alcool qui est aligné avec celui des peptaïbols à 11, 12 et 14 résidus.

La majorité des peptaïbols à 11 résidus ne présentent que deux motifs Aib-Pro et donc diffèrent des peptaïbols à 12 et 14 résidus qui en possèdent un troisième. Toutefois, les trichocryptines A, qui sont les seuls peptaïbols à 11 résidus possédant 3 motifs Aib-Pro sont très proches des peptaïbols à 12 et 14 résidus. En effet, chez ces derniers, l'ajout d'un résidu entre les 2 motifs Aib-Pro à partir de l'extrémité N-terminale, permet d'obtenir le modèle de séquence des peptaïbols à 12 résidus. De la même manière, l'ajout de deux résidus entre l'acide aminé acétylé N-terminal et le premier motif Aib-Pro, chez les peptaïbols à 12 résidus, permet d'obtenir le type de séquences observées chez les peptaïbols à 14 résidus.

Ainsi, ces observations tendent à montrer que des caractéristiques communes ont été gardées chez des familles de peptaïbols dans leur voie de biosynthèse. En d'autres termes, on pourrait supposer que les peptidases synthétases responsables de la biosynthèse des peptaïbols à 14 résidus auraient une origine commune avec celles responsables de la biosynthèse des peptaïbols à 12 et 11 résidus.

## I-2-2- Les peptaïbols à longues séquences (18 - 20 résidus)

Au même titre que les peptaïbols à courtes séquences, les peptaïbols longs peuvent se diviser en trois familles en fonction du nombre d'acides aminés les constituant. Ainsi, chez le genre *Trichoderma*, des peptaïbols à 18, 19 ou 20 résidus ont été décrits. Les peptaïbols longs sont connus pour représenter, d'une part, un groupe plus hétérogène que les peptaïbols courts compte tenu de la présence possible de quatre acides aminés supplémentaires (Glu, Gly, Trp, Phe) et d'autre part, ils présentent des caractéristiques de séquences qui leur sont propres comme une proportion importante d'Aib, une plus faible proportion de Pro (1 en général, 2 pour certains d'entre eux) et des amino-alcools spécifiques tels que le Pheol ou le Trpol jamais observés chez les peptaïbols courts. Ceci semblerait confirmer l'existence de peptidases synthétases différentes pour les peptaïbols courts et les peptaïbols longs.

De la même façon que pour les peptaïbols courts, une mise au point sur les caractéristiques et les variations structurales des trois grandes familles de peptaïbols longs est présentée dans le chapitre suivant.

### I-2-2-1- Peptaïbols à 20 résidus

Les peptaïbols à 20 résidus sont les premiers à avoir été décrits avec la découverte de l'alaméthicine en 1967 (Meyer et Reusser). Ils sont représentés par 10 familles et correspondent au plus grand nombre de séquences décrites : 120 au total sur 212 peptaïbols longs et 319 peptaïbols, ceci, uniquement pour les genres *Trichoderma/Hypocrea*.

Le Tableau 3-9, page suivante, reprend les caractéristiques structurales des séquences décrites pour les peptaïbols à 20 résidus produits par les genres *Trichoderma/Hypocrea*.

Tableau 3-9 : Caractéristiques et variations structurales des peptaïbols à 20 résidus

Familles de peptaïbols	Position																				Masses moléculaires (Da)						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
Hypelcines A	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	L	U	G	U	U	P	V	U	U	Q	Q	Lol	1913,5	1927,5	1941,6			
						A	(L)	I	(G)	(U)							J			lol							
Hypelcines B	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	L	U	G	U	U	P	V	U	U	E	Q	Lol	1914,5	1928,5	1942,5			
						(A)											J			lol							
Alaméthincines F30	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol	1948,6	1962,6	1976,7	1990,6		
						U	(E)	(U)	(A)	(V)							V			Fol		1963,6					
Alaméthincines F50	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1910,6	1924,5	1938,7	1952,6	1966,5	
				(A)	(U)	(A)	U	U	(V)	(Vx)	V						(Vx)			Fol							
					(G)		(L)	(Vx)	(A)											Fol							
Atroviridines	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1961,6	1975,7	1989,6			
						U												J		Fol							
Polysporines	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	V	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1961,6	1975,7	1989,6	2003,6		
										V								V		Fol							
										I										Fol							
Paracelsines	Ac	U	A	U	A	U	U	Q	U	L	U	G	U	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1907,5	1921,5	1935,5			
						A				V				(A)						Fol							
Suzukacillines A	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	Lx	U	G	U	U	P	Vx	U	Vx	Q	Q	Fol	1907,5	1921,5	1935,6	1949,5	1963,7	1977,6
						U		Vx			Lx						U	U		Fol							
Longibrachines A	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1935,6	1949,7	1963,6			
						U												J		Fol							
Longibrachines B	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol	1936,6	1950,6				
																		J		Fol							
Trichocellines A	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	L	U	G	U	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1921,5	1935,6				
										I			L					J		Fol							
Trichocellines B	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	L	U	G	U	U	P	V	U	U	E	Q	Fol	1922,5	1936,6				
																		J		Fol							
Saturnisporines VIII	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	L	U	G	U	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1921,5	1935,6				
						U												J		Fol							
Trichokonines VII	Ac	U	A	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1907,6	1921,5	1935,6	1949,7		
			(A)	(G)	(A)		(U)					(A)	(A)	(J)						Fol							
Trichosporines B-IVBVI	Ac	U	A	A	U	U	Q	U	Lx	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1907,6	1921,5	1935,6	1949,7	1963,7		
			G	(U)	(A)			I	(A)	(A)	Lx	A					J			Fol							
			(U)					L		Vx							Vx			Fol							
								V									(A)			Fol							
Trichosporines B-1 a/df	Ac	U	A	S	A	U	U	Q	U	Lx	U	G	Lx	A	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1951,6	1965,6				
										L		L								Fol							

Un modèle de séquence peut être proposé pour tous les peptaïbols à 20 résidus (Figure 3-3).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ac	U	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	P	x	U	x	x	Q	xol
	P	U	A	U	U	Q	U	Lx	U	G	Lx	U		Vx	U	Q		Fol	
	A	(A)	(U)	(A)	A	(E)	(Lx)	Vx	(A)	(U)	U	(A)		(A)	Vx	E		(Lxol)	
	(G)	(G)			(G)			(U)	(G)	(A)	(Vx)				(A)				
		(S)						(A)											

Figure 3-3 : Modèle de séquence-type des peptaïbols à 20 résidus

Les peptaïbols à 20 résidus sont tous caractérisés par la présence d'un Aib acétylé en position 1, d'une Pro en position 14 et d'une Gln en avant dernière position. La plupart des séquences observées présentent également une Gln supplémentaire en position 7. Un motif Aib-Pro est souvent rencontré en position 13-14. L'amino-alcool le plus souvent rencontré correspond à un phénylalaninol. D'autres régions

sont plus variables telles que les positions 2 (Pro/Ala), 6 (Ala /Aib), 9 (Lxx/Vxx ), 12 (Lxx/Aib), 17 (Vxx/Aib) et 18 (Gln/Glu).

Deux sous-familles peuvent être proposées par comparaison des alignements de séquences et en considérant le nombre de résidus Pro constituant les peptaïbols.

La première sous-famille regroupe les hypelcines, seuls peptaïbols à 20 résidus isolés des *Hypocrea*, les alaméthiciens, les atroviridines et les polysporines. Ces peptaïbols sont tous caractérisés par la présence de deux Pro en position 2 et 14. Il s'agit des seuls peptaïbols longs à en contenir deux dans leur séquence peptidique. Comme chez la plupart des peptaïbols, les positions des résidus correspondent à des parties constantes ou plus ou moins variables. Ainsi, des segments Aib-Pro constants sont présents aux positions 1-2 et 13-14.

De plus, les positions 16 et 19. sont toujours occupées respectivement par un Aib et une Gln. Un fragment peu variable est observé des positions 3 à 8, correspondant à l'alignement Aib<sub>3</sub>-Ala<sub>4</sub>-Aib<sub>5</sub>-Aib<sub>6</sub>-Gln<sub>7</sub>-Aib<sub>8</sub>, avec un échange, pour certaines séquences, d'une Ala par un Aib en position 3 et d'une Gln par un Glu en position 7. D'autres acides aminés sont beaucoup plus variables tels que ceux rencontrés aux positions 9, 12, 17 et 20.

Les peptaïbols de la seconde sous-famille présentent, contrairement aux précédents, un seul résidu Pro en position 14. La Pro en position 2 est remplacée, ici, principalement par une Ala. Les résidus constants sont retrouvés aux positions 1, 7, 8, 14, 19 et 20. Certaines trichosporines, isolées de l'espèce *T. polysporum* présentent une Ser à la place de l'Ala en position 3.

## I-2-2-2- Peptaïbols à 19 résidus

Les peptaïbols à 19 résidus sont beaucoup moins représentés que les précédents. Vingt séquences, appartenant à six peptaïbols, ont été décrites chez les *Trichoderma* (Tableau 3-10).

**Tableau 3-10 : Caractéristiques et variations structurales des peptaïbols à 19 résidus**

Peptaïbols ou famille de peptaïbols	Position																			Masses moléculaires (Da)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			
Tricholongines	Ac	U	G	F	U	U	Q	U	U	S	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Lol	1908,5	1922,6	
									(A)						J							
Trichokonine V	Ac	U	A	U	A	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1864,5	
Trichorzianine TA	Ac	U	A	A	U	U	Q	U	U	S	L	U	P	V	U	I	Q	Q	Wol		1947,6	
Trichorzianines TB	Ac	U	A	A	U	U	Q	U	U	S	L	U	P	L	U	I	Q	E	Fol	1909,6	1923,6	1937,6
					J									V				Wol		1948,6	1962,6	
Trichoningine KA V	Ac	U	G	A	U	I	Q	U	U	S	L	U	P	V	U	I	Q	Q	Lol	1888,6		
Trichostrigocines	Ac	U	A	U	A	Lx	Q	U	U	S	Lx	U	P	Vx	U	Vx	Q	Q	Lxol	1888,6		
Peptaïvirine A	Ac	F	U	S	U	J	L	Q	G	U	U	A	A	U	P	J	U	U	Q	Fol	1885,6	
Peptaïvirine B	Ac	F	U	A	U	J	L	Q	G	U	U	A	A	U	P	J	U	U	Q	Wol	1908,6	

Il est plus difficile pour ces peptaïbols de proposer un modèle de séquence compte tenu de la variabilité importante des résidus à chacune des positions. Toutefois, trois familles peuvent être séparées en fonction des fragments N-terminaux observés.

La première famille correspond aux tricholongines isolées de *Trichoderma longibrachiatum* (Rebuffat *et al.*, 1991) et plus récemment des espèces *T. cf. strigosum* et *T. pubescens* (Degenkolb *et al.*,

2006a). Ces peptaïbols présentent en début de séquence une Phe en position 3. Les résidus variables sont situés en position 10 où l'Ala peut être remplacée par une Ser et en position 16 où l'on peut trouver un Aib ou une Iva.

La deuxième et plus importante famille (trichokonine, trichorzianines, trichoningine et trichostrigocines) regroupe les séquences présentant des fragments N-terminaux plus conventionnels de type Ac-Aib<sub>1</sub>-Ala<sub>2</sub>/Ac-Aib<sub>1</sub>-Gly<sub>2</sub> et diffère donc des tricholongines par la présence des résidus Ala et Aib en position 3 à la place de la Phe. Les résidus constants sont situés aux positions 1, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 15 et 17. Notons que la trichokonine V diffère des autres peptaïbols par la présence d'une Gly en position 10 à la place d'une Ser. Les trichorzianines TB montrent aussi une originalité de séquence avec la présence du Glu à la place de la Gln en position 18. Trois amino-alcools sont rencontrés : Trpol, Pheol et Leuol.

La dernière sous famille des peptaïbols à 19 résidus concerne les peptaivirines, peptaïbols isolés d'une souche de *Trichoderma* non identifiée (Yun *et al.*, 2000). Ces peptaïbols divergent nettement des deux familles précédentes par la présence d'une Phe acétylée en position 1. Cette originalité de séquence n'a été observée que chez ces peptaïbols. Certains résidus, présents aussi chez les autres peptaïbols à 19 résidus, sont décalés d'une position. C'est le cas de la Gln en position 7, au lieu de la position 6, et du segment Aib-Pro en position 13-14 au lieu de 12-13. La fin de séquence C-terminale est également différente de celle retrouvée chez les deux autres familles avec un segment Aib<sub>17</sub>-Gln<sub>18</sub> au lieu de Gln<sub>17</sub>-Gln<sub>18</sub>.

### I-2-2-3- Peptaïbols à 18 résidus

Les peptaïbols à 18 résidus représentent, en nombre de séquences, la deuxième famille de peptaïbols longs après celle à 20 résidus. Huit séries de peptaïbols ont été décrites, 73 séquences ont été répertoriées. Les caractéristiques et les variations structurales des peptaïbols à 18 résidus sont présentées Tableau 3-11, page suivante.

Tableau 3-11 : Caractéristiques et variations structurales des peptaïbols à 18 résidus

Peptaïbols ou famille de peptaïbols	Position																		Masses moléculaires (Da)					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18						
Trichostromaticines	Ac	U	A	U	A	Vx	Vx	Q	U	Vx	U	Q	U	P	Lx	U	U	Q	Lxol	1759,5	1773,5	1787,5	1801,5	1815,5
						U	U					Lx						Vx						
Saturnisporine IV	Ac	U	A	U	A	U	Q	U	L	U	G	U	U	P	V	J	Q	Q	Fol	1779,5				
Trichovirines	Ac	U	G	A	L	U	Q	J	V	U	G	U	U	P	L	U	U	Q	Lol	1702,6	1716,6	1730,6	1744,6	
								J					U											
								(A)	(Vx)															
								(A)																
Trichotoxines A-40	Ac	U	G	U	L	U	Q	U	U	A	U	U	P	L	U	U	E	Vol	1712,4	1703,5	1717,4			
Trichotoxines A-50	Ac	U	G	U	L	U	Q	U	U	A	A	U	P	L	U	J	Q	Vol	1688,4	1702,5	1716,5	1730,5		
Neatroviridines	Ac	U	G	A	L	U	Q	U	L	U	G	J	U	P	L	U	U	Q	Lxol	1730,6	1744,6	1758,7		
Trichorzines HA	Ac	U	G	A	U	J	Q	U	V	U	G	L	U	P	L	U	J	Q	Lol	1702,5	1716,5	1730,5	1744,7	
Trichorzines MA	Ac	U	S	A	U	J	Q	U	L	U	G	L	U	P	L	U	U	Q	Vol	1732,5	1746,6	1760,6		
Trichorzines PA	Ac	U	S	A	U	J	Q	U	V	U	G	L	U	P	L	U	U	Q	Fol	1780,6	1794,6			
Trichorzine PAU4	Ac	U	S	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	L	U	U	Q	Vol	1805,5				
Trichorzines TVB	Ac	U	G	A	V	U	Q	U	A	U	S	L	U	P	L	U	U	Q	Vol	1704,5	1718,5	1732,6		
Trichokindines	Ac	U	S	A	U	U	Q	J	L	U	A	J	U	P	L	U	U	Q	lol	1746,5	1760,6	1774,6		
Hypomurocines B	Ac	U	S	A	L	U	Q	U	V	U	G	U	U	P	L	U	U	Q	Vol	1718,5	1732,6	1746,6		
Hypomurocine B11a	Ac	U	A	A	L	U	Q	U	V	U	G	U	U	P	L	U	U	Q	Vol	1702,5				

Les différentes séquences observées présentent des caractéristiques communes tel que l'Aib acétylé en position 1 et le segment Aib-Pro constant en position 12-13 (Figure 3-4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<b>Ac</b>	<b>U</b>	<b>x</b>	<b>U</b>	<b>P</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>xol</b>									
		A	U	L	U	Q	U	U	U	G	U			Lx	U	U	Q	Vxol
		G	A	U	Vx	(E)	Vx	Vx	(A)	(A)	Vx			(Vx)	(Vx)	Vx	(E)	Lxol
		S		(A)	(A)	(U)	(A)	Lx	(Vx)	(U)	Lx					Q		Fol
				(Vx)			(Q)	(A)	(Lx)	(S)	(A)							Wol
											(Q)							

Figure 3-4 : Modèle de séquence-type des peptaïbols à 18 résidus

Ces peptaïbols peuvent être séparés en trois familles en fonction du nombre et de la position des résidus Gln ou Glu.

La première famille concerne uniquement les cinq séquences microhétérogènes des trichostromaticines isolées récemment de *T. stromaticum* (Degenkolb *et al.*, 2006a). Trois Gln sont présents dont deux à des positions, 7 et 11, peu habituelles pour des peptaïbols longs.

La deuxième sous-famille équivaut à la saturnisporine IV, seule saturnisporine constituée de 18 résidus. Elle aussi présente trois résidus Gln aux positions 6, 16 et 17 et se rapproche ainsi des peptaïbols longs à 19 et 20 résidus connus pour contenir deux résidus Gln à l'extrémité C-terminale.

La dernière sous-famille regroupe les six peptaïbols restants dont les hypomurocines B isolées d'*Hypocrea muroiana*. Tous ces peptaïbols contiennent deux Gln aux positions 6 et 17. Dans certains cas, la Gln est remplacée par le Glu comme c'est le cas pour les trichotoxines A-40. Certaines séquences présentent une Ser en position 2 à la place d'une Ala ou d'une glycine (trichorzines MA, PA, trichokindines, hypomurocines B). Les trichorzines TVB, isolées de *T. virens*, montrent une inversion des résidus serine et glycine aux positions 2 et 10. Il est intéressant de noter que la présence d'une Ser en position 10, originale pour des peptaïbols à 18 résidus, est par contre caractéristique des peptaïbols longs à 19 résidus (cf. Tableau 3-10, page 154).

## I-3- Activités biologiques des peptaïbols

Les peptaïbols sont connus pour exercer de nombreuses activités principalement dues à leur conformation qui va leur permettre d'interagir avec les membranes biologiques en formant des pores.

### I-3-1- Conformation des peptaïbols

Les peptaïbols forment généralement des structures secondaires hélicoïdales amphipathiques. En effet, la présence des résidus  $\alpha,\alpha$ -dialkylés comme l'Aib ou l'Iva contraint le squelette peptidique à adopter une conformation en hélice  $\alpha$ ,  $3_{10}$  ou  $\alpha/3_{10}$  en fonction de la longueur de chaîne de la séquence, du nombre d'Aib et de leur localisation. Généralement les peptides de plus de 10 résidus se structurent en hélices  $\alpha$ .

Lorsqu'une alternance régulière d'Aib et de Pro est présente au sein de la séquence, une structure particulière appelée ruban de coude  $\beta$  ( *$\beta$ -bend ribbon spiral*) est observée (Karle *et al.*, 1987; Di Blasio *et al.*, 1992). Il s'agit là encore d'une structure hélicoïdale régulière dérivant de l'hélice  $3_{10}$  et présentant des caractéristiques intermédiaires entre les hélices  $\alpha$  et  $3_{10}$ .

En conformation hélicoïdale, les résidus vont disposer leurs chaînes latérales vers l'extérieur de l'hélice et s'organiser en formant un cylindre. Les peptaïbols sont alors amphiphiles, une face du cylindre va être hydrophile, contenant les résidus hydrophiles alors que l'autre sera hydrophobe (Sansom, 1993a).

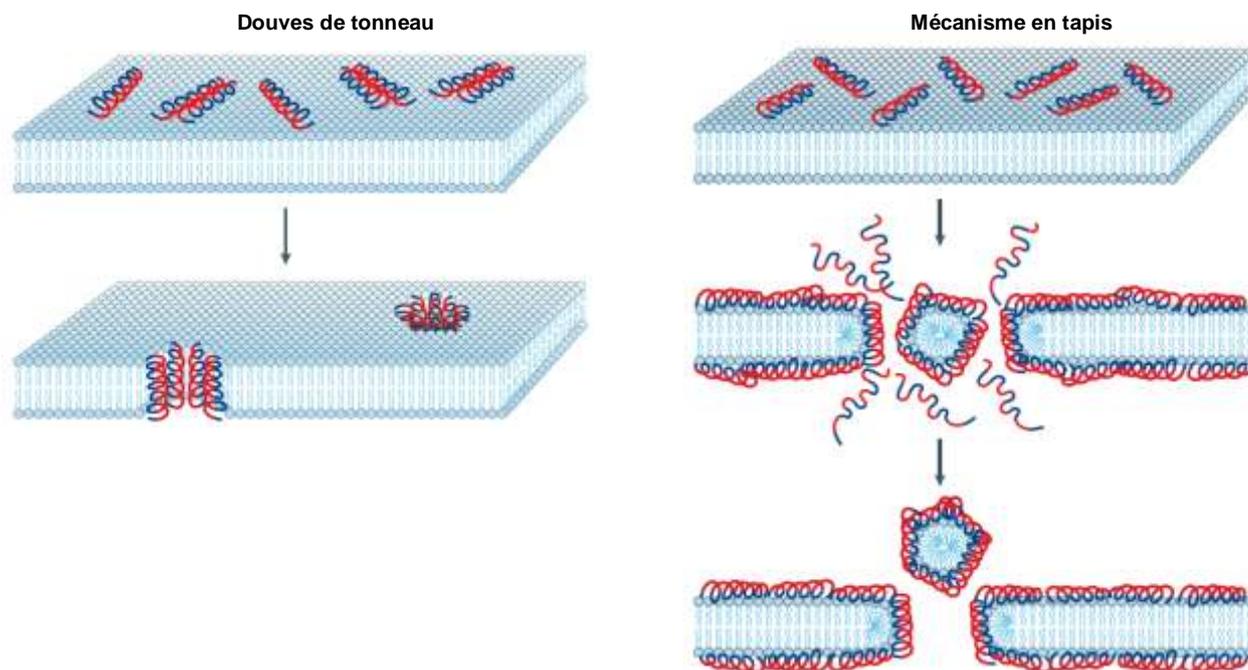
Cette structure en hélice détermine un dipôle où les extrémités N et C-terminales constituent respectivement les pôles positif et négatif. Cette formation d'un moment dipolaire va intervenir dans les mécanismes d'action membranaires (Oh *et al.*, 2000).

### I-3-2- Propriétés membranaires des peptaïbols

Il est aujourd'hui admis que les peptaïbols interagissent facilement avec les membranes biologiques en modifiant leur perméabilité par la formation de canaux ioniques voltage-dépendants transmembranaires (El Hajji *et al.*, 1989; Sansom, 1993b; Béven *et al.*, 1998). Il y a alors perturbation de la perméabilité membranaire, principalement due au passage de cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) et, à terme, mort cellulaire.

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer d'une part l'insertion des peptides dans la bicouche lipidique et d'autre part l'activation du canal conducteur voltage-dépendant. Ces études ont principalement été réalisées sur les alaméthicines, en tenant compte uniquement des caractéristiques structurales de cette famille de peptaïbols.

En ce qui concerne la perméabilité des membranes par l'insertion des peptides, deux modèles dit en « **douves de tonneau** » ou "*barrel-stave*" model et « **mécanisme en tapis** » ou "*carpet-like mechanism*" ont été décrits (Figure 3-5).



**Figure 3-5 : Modèles de perméabilité membranaire des peptides**

(D'après Brogden, 2005)

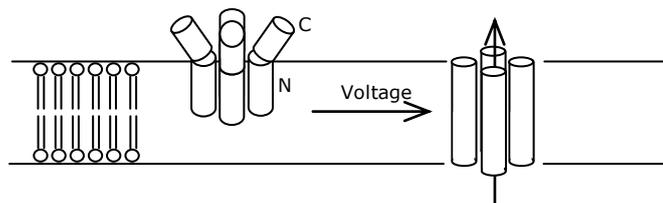
Le modèle en « douves de tonneau » proposé par Baumann et Mueller en 1974 suggère que les canaux sont constitués de plusieurs monomères qui s'assemblent en positionnant d'une part leurs parties hydrophobes, au contact avec les AG des bicouches lipidiques et d'autre part leurs parties hydrophiles vers l'intérieur, formant un pore hydrophile. Ces assemblages sont ainsi stabilisés par différents types d'interactions (Sansom, 1993b):

- **peptide-peptide** entre les résidus d'une hélice avec ceux des hélices voisines
- **peptide-lipide** entre les résidus hydrophobes et les lipides vers l'extérieur
- **peptide-eau** entre les résidus hydrophiles et des molécules d'eau au niveau du pore, à l'intérieur

Le modèle du « mécanisme en tapis » (Pouny *et al.*, 1992; Epanand *et al.*, 1995) propose une perturbation de la bicouche lipidique entraînant une désorganisation totale de celle-ci. Les peptides sont attirés par des forces électrostatiques vers les têtes anioniques des phospholipides sur plusieurs sites recouvrant la membrane et vont former un tapis en positionnant leur face hydrophobe au contact de la membrane. A de fortes concentrations, ils désorganisent les membranes de la même façon que des détergents et finissent par les désintégrer totalement en formant des micelles.

En ce qui concerne l'activation du canal conducteur par la différence de potentiel, là encore plusieurs hypothèses ont été décrites comme la réorientation des hélices agrégées antiparallèles en hélices parallèles qui activent l'ouverture du canal devenu hydrophile (modèle « flip-flop ») (Boheim *et al.*, 1983) ou

encore, par insertion des hélices présentes à la surface, grâce à une rotation de 90° comme le proposaient Baumann et Mueller . Nous retiendrons le modèle proposé par Fox et Richards pour l'alaméthicine (1982) (Figure 3-6).



**Figure 3-6 : Modèle du changement conformationnel dépendant du potentiel**

Ce modèle a été conforté plus récemment par les travaux de Cafiso (1994). La différence de potentiel va provoquer le changement de conformation des monomères partiellement présents dans la membrane, qui vont alors pouvoir se rassembler pour former les canaux. La partie hydrophobe de l'alaméthicine (partie N-terminale) pénètre spontanément dans la membrane.

La présence d'une Pro dans la séquence forme un coude dans l'hélice qui correspond à la jonction entre parties N et C-terminales, cette dernière reste ainsi à l'extérieur, le long de la membrane. Sous influence du potentiel, il y a modification de la conformation au niveau du coude de l'hélice, permettant la pénétration du reste de l'hélice dans la membrane et alors la formation des canaux, de type « douves de tonneau » qui vont autoriser le passage transmembranaire des ions

Comme nous l'avons mentionné, les activités membranaires des peptaïbols ont été principalement étudiées sur les alaméthicines. De nombreux peptaïbols décrits ont des caractéristiques structurales très différentes de cette dernière et les mécanismes d'action au niveau de la perméabilité membranaire peuvent en être d'autant plus variables.

En ce qui concerne les peptaïbols courts par exemple, il est admis que, bien que pénétrant dans les membranes, les mécanismes mis en jeu vont être différents. Une des hypothèses postulée est, n'étant pas assez longs pour traverser la membrane, ils vont s'associer deux à deux au centre de la membrane par leurs extrémités N-terminales et alors pouvoir, comme les peptaïbols longs, former des canaux ioniques (Chugh et Wallace, 2001).

De même pour l'insertion des lipopeptaïbols (Monaco *et al.*, 1999), le mécanisme de changement conformationnel proposé par Fox et Richards n'est pas applicable compte tenu, d'une part, de leur longueur de chaîne, et d'autre part de leur structure conformationnelle différente de celle des alaméthicines. Le mécanisme en tapis s'avère donc pour ce type de peptaïbols plus approprié.

Les études relatives aux peptaïbols courts étant moins nombreuses que celles concernant les peptaïbols longs, le mécanisme de perméabilité membranaire reste moins clair et les travaux se poursuivent pour proposer des modèles spécifiques à cette classe particulière de peptaïbols.

Cette capacité à s'insérer dans les membranes biologiques confère aux peptaïbols de nombreuses activités biologiques dont les plus connues sont celles antibiotiques. Là encore, tous les peptaïbols étudiés ne présentent pas les mêmes activités biologiques, cela dépendant directement de leur faculté à s'insérer plus ou moins facilement dans les membranes biologiques.

### I-3-3- Activités biologiques découlant des propriétés membranaires des peptaïbols

Comme nous l'avons montré précédemment, les peptaïbols appartiennent à la famille des peptaïbiotiques dont ils représentent le groupe majoritaire. Les peptaïbols, mais également les autres peptaïbiotiques (lipopeptaïbols et lipoaminopeptides) sont connus pour présenter de nombreuses activités antibiotiques et notamment antibactériennes. Depuis leur découverte à la fin des années 60 jusqu'à aujourd'hui, d'autres activités biologiques leur ont également été associées, faisant des peptaïbols, et plus généralement des peptaïbiotiques, un groupe peptidique à large spectre d'activité : antibiotique, cytotoxique, hémolytique, neuroleptique...

#### I-3-3-1- Activités antibiotiques

##### I-3-3-1-1- Activités antibactériennes

Les peptaïbols ont été principalement étudié pour leurs activités antibiotiques, notamment antibactériennes avec l'émergence de souches pathogènes résistantes aux antibiotiques et la lutte biologique contre les agents pathogènes terrestres des plantes (Tableau 3-12).

**Tableau 3-12 : Peptaïbols et autres peptaïbiotiques antibactériens**

Cibles antibactériennes	Familles	PC	PL	LP	AP	Références
Bactéries à gram positif	Harzianines	x				(Rebuffat <i>et al.</i> , 1995)
	Ampullosporines	x				(Ritzau <i>et al.</i> , 1997)
	Alaméthiçines		x			(Meyer et Reusser, 1967)
	Paracelsines		x			(Brückner et Graf, 1983)
	Saturnisporines		x			(Rebuffat <i>et al.</i> , 1993)
	Trichorzines		x			(Goulard <i>et al.</i> , 1995)
	Chrysospermines		x			(Kim <i>et al.</i> , 2000)
	Trichokonines		x			(Xiao-Yan <i>et al.</i> , 2006)
	Trichongine				x	(Auvin-Guette <i>et al.</i> , 1992)
	Trikoningines				x	(Auvin-Guette <i>et al.</i> , 1993)
	Hélioférines				x	(Gräfe <i>et al.</i> , 1995)
Mycoplasmes	Alaméthiçines	x				(Rebuffat <i>et al.</i> , 2000)
	Alaméthiçines		x			(Béven et Wróblewski, 1997)
	Trichorzines		x			(Béven <i>et al.</i> , 1999)
	Longibrachines		x			(Béven <i>et al.</i> , 1998)
	Harzianines		x			(Leclerc <i>et al.</i> , 2001)

Les peptaïbols sont connus pour être principalement actifs contre les bactéries à gram positif. Ainsi, la plupart des peptaïbols longs comme l'alaméthiçine (Meyer et Reusser, 1967), les paracelsines (Brückner et Graf, 1983), les saturnisporines (Rebuffat *et al.*, 1993), les trikonines (Auvin-Guette *et al.*, 1993) ou encore les trichorzines (Goulard *et al.*, 1995) inhibent la croissance de *Staphylococcus aureus* mais se montrent inactifs sur les bactéries à gram négatif comme *Escherichia coli*. Les mêmes observations ont été obtenues plus récemment avec les trichokonines qui ont été testées sur plusieurs bactéries à gram positif et négatif (Xiao-Yan *et al.*, 2006). Nous pouvons également citer les chrysospermines (19 résidus), isolées d'*Apiocrea* sp., qui inhibent la croissance de *Corynebacterium lilium*, une autre bactérie à gram positif pathogène des plantes (Kim *et al.*, 2000).

Il est difficile de proposer un ordre de grandeur de l'inhibition bactérienne compte tenu du fait que les différents tests antibactériens réalisés ne sont pas standardisés. En revanche, il est important de noter que les tests antibiotiques réalisés sur les peptaïbols courts ont souvent montré qu'ils étaient inactifs sur les mêmes cibles bactériennes. Seuls les harzianines HC (14 résidus), inhibent la croissance de *S. aureus*

mais à des doses plus élevées (50 µg/disque) que celles des peptaïbols longs (3 µg/disque) (Rebuffat *et al.*, 1999). Les peptaïbols à 11 résidus comme l'harzianine HB sont, eux, inactifs (Augeven-Bour *et al.*, 1997). L'ampullosporine I, peptaïbol à 15 résidus isolé de *Sepedonium ampullosporum* (caractérisé par la présence d'un Trp acétylé en position 1 et l'absence de Pro) montre un spectre d'activité antibactérien étroit principalement dirigé contre *Bacillus subtilis* et *S. aureus* (Ritzau *et al.*, 1997).

Ces travaux montrent que l'activité antibactérienne est totalement dépendante de la longueur de chaîne du peptaïbol. Plus celle-ci est courte, plus l'insertion dans la membrane bactérienne est difficile. En dessous de 14 résidus, il semble plus difficile aux peptaïbols de réagir avec les membranes bactériennes. Il y a donc bien relation directe entre le mécanisme d'insertion membranaire et l'activité antibactérienne.

Il faut noter que les lipopeptaïbols et les lipoaminopeptides présentent, contrairement aux peptaïbols courts, des activités antibactériennes similaires à celles des peptaïbols longs. Ainsi les trikoningines KB, lipopeptaïbols à 11 résidus acylés à l'extrémité N-terminale par une chaîne grasse constituée de 8 carbones, inhibent la croissance de *S. aureus* (Auvin-Guette *et al.*, 1993) ou les hélioférines (lipoaminopeptides à 8 résidus isolés de *Mycogone rosea* similaires aux trichopolynes et trichoférines) montrent de fortes activités antibactériennes comprises entre 0,8 et 3 µg/mL (Gräfe *et al.*, 1995). Malgré leur petite taille, la présence d'une chaîne lipophile à l'extrémité N-terminale pour les lipopeptaïbols et d'acides lipoaminés chez les lipoaminopeptides leur permet donc de s'insérer plus facilement dans la membrane et de modifier ainsi la perméabilité membranaire. L'hydrophobie générale est donc un deuxième paramètre à prendre en compte dans le phénomène d'insertion membranaire et donc d'activité biologique.

### **Le cas particulier des mycoplasmes**

Les mycoplasmes sont des bactéries dépourvues de paroi, de petite taille (300 nm) et, de ce fait, non perceptibles au microscope optique. Ils sont largement répandus dans la nature, chez les animaux, les insectes et les plantes. Chez l'homme, la plupart des espèces isolées sont commensales ou occasionnellement pathogènes. Leur cytoplasme contient un génome très court et des ribosomes. La membrane en trois feuilletts contient des lipides en grande quantité, des glucides, des glycolipides et des protéines. Elle est supposée jouer un rôle central dans le pouvoir pathogène.

De nombreux peptaïbols ont été testés sur les mycoplasmes et se sont avérés actifs. Ce sont les peptaïbols longs qui ont été testés dans un premier temps sur les genres *Acholeplasma*, *Mycoplasma* et les *Spiroplasma* (Béven et Wróblewski, 1997; Béven *et al.*, 1998; Béven *et al.*, 1999; Leclerc *et al.*, 2001). Les peptaïbols à 11 et 14 résidus ont été testés et se sont révélés actifs sur les mycoplasmes alors qu'ils ne le sont peu ou pas sur les bactéries à gram positif. Ceci montre bien qu'en présence d'une membrane plus fine et moins complexe, ils sont capables de s'insérer et former des pores.

Les pseudokonines, peptaïbiotiques à 8 et 10 résidus, similaires des peptaïbols à 11 résidus et ne comportant pas de terminaison C-terminale hydroxylée, sont eux totalement inactifs (Rebuffat *et al.*, 2000). Les auteurs ont suggéré que cette inactivité était principalement due à la longueur de chaîne et qu'une taille minimale de 11 résidus était indispensable aux peptaïbols pour s'insérer dans les membranes plasmiques des mycoplasmes. Compte tenu, d'une part, de la conformation similaire des pseudokonines et des harzianines à 11 résidus et, d'autre part, de la présence chez la pseudokonine KL VI du groupement C-terminal hydroxy-cétopipérazine, décrit comme pouvant potentiellement intervenir dans des mécanismes d'action antimicrobiens, l'absence d'activité ne peut alors être liée qu'à une longueur insuffisante de chaîne.

Les études réalisées sur les mycoplasmes ont ainsi permis de mieux comprendre la relation activité/insertion membranaire des peptaïbols.

### I-3-3-1-2- Activités antifongiques

Les activités antifongiques des peptaïbols ont également été testées sur plusieurs espèces de champignons, unicellulaires ou filamenteux. Le Tableau 3-13 recense les familles de peptaïbols mais aussi de lipoaminopeptides pour lesquels des activités antifongiques ont été observées.

**Tableau 3-13 : Peptaïbols et autres peptaïbiotiques antifongiques**

Cibles antifongiques	Familles	PC	PL	AP	Références
Levures	Trichokonines		x		(Xiao-Yan <i>et al.</i> , 2006)
	Trichopolynes			x	(Fuji <i>et al.</i> , 1978)
	Hélioférines			x	(Gräfe <i>et al.</i> , 1995)
Champignons filamenteux pathogènes	Harzianines	x			(Rebuffat <i>et al.</i> , 1995)
	Ampullosporines	x			(Ritzau <i>et al.</i> , 1997)
	Alaméthiçines		x		(Meyer et Reusser, 1967)
	Trichorzianines		x		(Schirmbock <i>et al.</i> , 1994)
	Trichorzines		x		(Goulard <i>et al.</i> , 1995)
	Atroviridines		x		(Oh <i>et al.</i> , 2002)
	Néotroviridines		x		(Oh <i>et al.</i> , 2002)
	Trichokonines		x		(Xiao-Yan <i>et al.</i> , 2006)
	Trichopolynes			x	(Fuji <i>et al.</i> , 1978)
	Hélioférines			x	(Gräfe <i>et al.</i> , 1995)

Les peptaïbols longs mais également les lipopeptaïbols se révèlent plus antifongiques que les peptaïbols courts. Récemment, les trichokonines se sont révélées inhibitrices de la croissance de nombreux champignons filamenteux phytopathogènes appartenant aux genres *Fusarium*, *Botrytis*, *Curvularia*, *Rhizoctonia*, *Colletotrichum* et *Drechslera*.

Chez les peptaïbols courts, seuls les harzianines HC (14 résidus) et les ampullosporines (15 résidus) ont été décrits comme présentant une activité antifongique. Toutefois, l'activité des peptaïbols courts est plus faible que celle des peptaïbols longs. A 100 µg/mL, les harzianines HC inhibent 40% de la croissance de *Sclerotium cepivorum* contre 70% pour les trichorzines (18 résidus) (Goulard *et al.*, 1995). L'ampullosporine I s'est montrée active contre la croissance des levures *Rhodotorula rubra* et *Sporobolomyces salmonicolor* mais inactive sur *Candida albicans*.

Les lipoaminopeptides et notamment les hélioférines inhibent la croissance de certains champignons comme les levures *Rhodotorula rubra* et *Candida albicans* et les moisissures *Penicillium notanum*, *Fusarium culmorum* et *Kloeckera brevis* avec des CMI comprises entre 1 et 6 µg/mL.

### I-3-3-1-3- Activités antivirales et antiparasitaires

Des activités antivirales et antiparasitaires ont été décrites chez les peptaïbols longs exclusivement. Les peptaïbols à 19 résidus des familles des chrysospermines (*Apiocrea chysosperma*) et des peptaivirines (*Trichoderma* spp.) se sont révélées efficaces contre l'infection provoquée par le virus mosaïque du tabac qui décolore et/ou déforme partiellement les feuillages des plantes atteintes avec une inhibition de l'infection de 50 à 80% à 10 µg/mL (Kim *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2000).

Deux études rapportent des activités antiparasitaires chez les peptaïbols. La première concerne les antiamebíes, peptaïbols à 16 résidus, isolées des genres *Emericellopsis* et *Acremonium* et qui présentent une activité antihelminthique (Thirumalachar, 1968). La seconde est relative à l'activité antiparasitaire et spécialement contre l'amibe *Dictyostelium* sp. pour les peptaïbols à 19 résidus de la famille des trichorzianines (El Hajji *et al.*, 1989). Les auteurs ont ainsi montré le rôle important joué par la charge négative C-terminale dans l'interaction avec les membranes. En effet, les trichorzianines TA III,

possédant une Gln en position 18 ont montré des propriétés inhibitrices et des lyses cellulaires plus importantes que les TB III dont l'extrémité C-terminale contient un Glu.

### I-3-3-2- Activités cytotoxiques

Bien que de nombreuses études relatives aux activités cytotoxiques sur les cellules de mammifères aient été décrites, elles concernent exclusivement les peptaïbols longs, les lipopeptaïbols et les lipoaminopeptides (Tableau 3-14).

**Tableau 3-14 : Peptaïbols et autres peptaïbiotiques cytotoxiques**

Activités cytotoxiques	Familles	PL	LP	AP	Références	
Activité anticancéreuse sur différentes lignées cellulaires	Chrysospermines	x			(Kim <i>et al.</i> , 2000)	
	Atroviridines	x			(Oh <i>et al.</i> , 2002)	
	Néoatroviridines	x			(Oh <i>et al.</i> , 2002)	
	*	x			(Peltola <i>et al.</i> , 2004)	
	LP 237-F8			x		(Tsantrizos <i>et al.</i> , 1996)
	Hélioferines				x	(Gräfe <i>et al.</i> , 1995)
Lyse de leucocytes	Culicinines			x	(He <i>et al.</i> , 2006)	
	Alaméthicine	x			(Irmischer et Jung, 1977)	
	Trichotoxine	x			(Irmischer et Jung, 1977)	
	Hélioferines			x	(Grigoriev <i>et al.</i> , 1996)	
Activité hémolytique sur érythrocytes	Alaméthicine	x			(Irmischer et Jung, 1977)	
	Trichotoxine	x			(Irmischer et Jung, 1977)	
	Paracelsines	x			(Jaworski <i>et al.</i> , 1999)	
Immobilité des spermatozoïdes de porc	*	x			(Peltola <i>et al.</i> , 2004)	

\* Peptaïbols à 18 résidus

Aucune étude n'a, à ce jour, décrit la cytotoxicité des peptaïbols à courtes séquences. Les peptaïbols longs comme l'alaméthicine ou la trichotoxine ont ainsi été décrits comme provoquant l'hémolyse d'érythrocytes, la lyse de leucocytes ou encore l'immobilité des spermatozoïdes. Ils entraînent une sécrétion de catécholamine par les cellules chromaffines adrénaliennes due à l'afflux externe d'ions calcium provoqué par la formation des canaux calciques voltage-dépendants (Tachikawa *et al.*, 1991) et sont responsables du découplage de la phosphorylation oxydative au sein des mitochondries (Takaishi *et al.*, 1980 ; Matha *et al.*, 1992). Ces activités biologiques ont également été observées chez les lipoaminopeptides comme les hélioferines (Gräfe *et al.*, 1995; Grigoriev *et al.*, 1996) et les culicinines (He *et al.*, 2006) et chez les lipopeptaïbols (Tsantrizos *et al.*, 1996).

Une activité immuno-suppressive chez des souris allogéniques a également été décrite pour les lipoaminopeptides de la famille des tichopolynes (Iida *et al.*, 1999).

### I-3-3-3- Activités sur souris

La toxicité des peptaïbols a été testée sur souris. Après une injection intrapéritonéale de peptaïbols aussi bien que courts que longs, une hypothermie et une activité neuroleptique sont observées. Néanmoins, à des doses de paracelsine (20 résidus) supérieures à 5 mg/kg, la mort de l'animal survient (Brückner *et al.*, 1984; Jaworski *et al.*, 1999), ce qui n'est pas observé avec les trichofumines (11 et 13 résidus) ou les bergofumines (15 résidus), isolées d'*Emericellopsis donezkii* (Berg *et al.*, 1999). Les ampullosporines provoquent également une hypothermie chez la souris accompagnée d'une diminution de l'activité locomotrice spontanée sans pour autant entraîner la mort de l'animal (Ritzau *et al.*, 1997), confortant l'importance de la taille du peptaïbol dans la virulence de la toxicité.

### I-3-3-4- Toxicité sur larves

Les peptaïbols se sont avérés toxiques sur différentes larves d'insectes et de crustacés (Tableau 3-15).

Tableau 3-15 : Toxicités larvaires des peptaïbols

Toxicité larvaire	Familles	PC	PL	LP	AP	Références
Diptères ( <i>Phormia terra nova</i> )	*		x			(Landreau <i>et al.</i> , 2002)
Moustiques ( <i>Culex pipiens</i> )	Antiamoebines Alaméthიცines Paracelsines Trichotoxines Tolypines	x		x x x		(Matha <i>et al.</i> , 1992)
Artémies ( <i>Artemia salina</i> )	Antiamoebines Alaméthიცines Paracelsines	x	x x		x	(Favilla <i>et al.</i> , 2006)
Daphnies ( <i>Daphnia magna</i> )	Antiamoebines Alaméthიცines Paracelsines	x	x x			(Favilla <i>et al.</i> , 2006)
Huîtres ( <i>Crassostrea gigas</i> )	Trichobrachines Alaméthიცine *	x		x		(Poirier <i>et al.</i> , 2007b)

\* Mélange de peptaïbols à 20 résidus

Landreau *et al.* (2002) ont montré que des mélanges de peptaïbols à 20 résidus isolés d'une souche marine de *Trichoderma koningii* provoquaient une paralysie totale et immédiate des larves de diptères entraînant la mort après injection au niveau du dernier segment abdominal, laissant présager une activité neurotoxique.

En 1992, Matha *et al.* ont étudié les altérations morphologiques découlant des effets de différents peptaïbiotiques sur les larves de moustiques. Des peptaïbols de 20 résidus (alaméthიცine F30 et paracelsine A), 18 résidus (trichotoxine 50 E) et 16 résidus (antiamoebine I) ainsi qu'un lipoaminopeptide de 15 résidus (tolypine, isolé de *Tolypocladium inflatum*) ont été testés et leur toxicité comparée. Tous les peptaïbiotiques testés induisaient des effets irréversibles accompagnés des mêmes symptômes liés à des dommages au niveau mitochondrial. Trois groupes ont été distingués : la tolypoline était la plus toxique avec une DL<sub>50</sub> de 0,1 µg/mL, suivie des peptaïbols à 20 résidus (alaméthიცine et paracelsine, DL<sub>50</sub> de 110 et 130 µg/mL respectivement). Les deux derniers peptaïbols respectivement de 18, 16 résidus, étaient les moins toxiques (DL<sub>50</sub> de 200 µg/mL). Cette étude montre encore une fois, sur des tests réalisés *in vivo* que la toxicité dépend à la fois de la longueur de chaîne, mais aussi de l'hydrophobie générale, le lipoaminopeptide correspondant au peptaïbiotique le plus hydrophobe et toxique.

Les alaméthიცines, les paracelsines et les antiamoebines ont également été testées sur des larves de crustacés (artémies et daphnies) (Favilla *et al.*, 2006). Là aussi, une toxicité a été observée pour les trois familles de peptaïbols. Néanmoins, l'alaméthიცine présentait une toxicité 4 à 5 fois plus importante que la paracelsine et l'antiamoebine sur *Artemia salina* et 6 à 10 fois plus importante sur *Daphnia magna*. Cette étude montre, comme les études précédentes, l'importance de la longueur de chaîne dans la bioactivité des peptaïbols mais également que d'autres facteurs peuvent intervenir. En effet, la paracelsine, bien que constituée de 20 résidus, comme l'alaméthიცine, est moins toxique que cette dernière. Or lorsque les types de séquences caractérisant ces deux familles sont comparés (*cf.* Tableau 3-9, page 153), la principale différence équivaut à la présence d'une Pro en position 2 à la place d'une Ala chez les alaméthიცines. Cette dernière doit donc jouer un rôle important dans les phénomènes de toxicité.

Récemment, des études menées au Laboratoire ont montré que les peptaïbols présentent une toxicité sur le développement larvaire de l'huître *Crassostrea gigas* (Poirier *et al.*, 2007b). Trois familles de peptaïbols ont été testées, des peptaïbols à 11 (trichobrachines) et 20 résidus isolés de la souche *T. longibrachiatum* MMS 151 ainsi que de l'alaméthicine commerciale. Les trois familles de peptaïbols provoquent la même anomalie larvaire, à savoir une protubérance du manteau liée à une irrégularité de la marge de la coquille. Néanmoins, la  $CE_{50}$  observée est plus faible pour les peptaïbols à 20 résidus et l'alaméthicine commerciale (respectivement 30 et 10 nM pour des masses moléculaires moyennes de 1943 et 1969 Da) que celle des peptaïbols à 11 résidus (64 nM pour une masse moléculaire moyenne de 1160 Da). Ces résultats confirment d'une part, le fort potentiel toxique des peptaïbols et d'autre part, l'importance de la longueur de chaîne dans ces phénomènes de toxicité.

### I-3-3-5- Bilan

Les peptaïbols peuvent présenter des activités biologiques assez variées. Toutefois, ce sont principalement les peptaïbols à longues séquences qui présentent le plus large spectre d'activité alors que les peptaïbols courts semblent plus spécifiques (Tableau 3-16).

**Tableau 3-16 : Activités biologiques recensées pour les peptaïbols à courtes et longues séquences**

Activités	Peptaïbols courts	Peptaïbols longs
Antibactérienne	x	x
Antifongique	x	x
Antivirale		x
Antiparasitaire		x
Cytotoxicité		x
Neuroleptique	x	x
Toxicité larvaire		x

Ces études montrent bien que les peptaïbols, en fonction de leur caractéristiques structurales, peuvent exercer des activités biologiques plus ou moins diverses et d'intensité plus ou moins importantes, étroitement liées à leur capacité à s'intégrer dans la membrane des cellules de leur hôte.

Différents facteurs interviennent, certains propres aux peptaïbols, comme la nature des acides aminés les constituant, la longueur de la chaîne, l'hydrophobie globale. D'autres sont propres aux membranes des cellules cibles, comme l'épaisseur de la bicouche lipidique, les taux d'hydratation et de cholestérol membranaires.

## P3-II- Méthodologies utilisées

Les peptaïbols sont des peptides linéaires qui, du fait de leur composition particulière, sont lipophiles et sont extractibles de la même manière que les autres substances lipophiles. C'est pourquoi, bien que ce ne soit pas la méthode d'extraction conventionnelle pour les peptaïbols, nous avons choisi de les rechercher dans les mêmes extraits que ceux utilisés dans la seconde partie de ce travail pour étudier les lipides. Les extraits bruts seront donc ceux obtenus après extraction des biomasses fongiques avec le dichlorométhane et le méthanol.

### II-1- Obtention des peptaïbols

La purification des peptaïbols à partir des extraits lipophiles contenant les lipides a été réalisée par étapes chromatographiques. Deux techniques ont été utilisées : la chromatographie d'adsorption sur gel de silice en colonne ouverte suivie d'une étape de CLHP sur phase inverse pour la purification des peptaïbols.

#### II-1-1- Chromatographie liquide sur colonne ouverte

Les fractions contenant les peptaïbols ont été purifiées par chromatographie liquide en colonne ouverte sur gel de silice et à pression constante. Une première chromatographie est réalisée sur l'extrait brut, permettant d'obtenir trois fractions globales par élution successive de dichlorométhane, acétone et méthanol (cf. Partie 2, page 54). Les fractions acétone et méthanol obtenues sont, par la suite, purifiées par une seconde étape de chromatographie liquide (silice) avec une phase mobile qui consiste en un mélange binaire dichlorométhane/méthanol. Un gradient discontinu croissant en méthanol de 0 à 20% est réalisé, le passage d'un mélange à un autre est contrôlé par bilan massique et par analyse CCM.

#### II-1-2- Purification par CLHP

Les peptaïbols sont purifiés par CLHP sur phase inverse C18 (silice greffée par des groupements octadécyles) en utilisant un mélange binaire méthanol/eau comme phase mobile. Les conditions employées se réfèrent aux études antérieures réalisées au Laboratoire pour la séparation des peptaïbols par CLHP (Landreau *et al.*, 2002; Mohamed-Benkada *et al.*, 2006).

Les peptaïbols sont détectés par leur absorbance dans l'ultraviolet à une longueur d'onde de 230 nm. A cette longueur d'onde, ce sont principalement les liaisons peptidiques qui absorbent chez ce type de composés. On peut donc considérer que l'intégration des aires entre la courbe et la ligne de base est proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques, donc au nombre d'acides aminés constituant les peptides. Pour un mélange de peptides contenant le même nombre de résidus, par exemple des peptaïbols à 11 résidus, l'abondance relative des pics UV sera proportionnelle à la quantité de produit détecté.

## II-2- Détection des peptaïbols dans les fractions chromatographiques

### II-2-1- Analyses CCM

La recherche des peptaïbols dans les extraits lipophiles et les fractions chromatographiques a été réalisée par CCM en utilisant la révélation à l'orcinol. Ce révélateur permet de détecter la présence des peptaïbols : ces derniers n'étant pas colorés par l'orcinol, ils apparaissent sous forme de tâches blanchâtres par contraste avec le reste de la plaque, jaunissant à la chaleur.

Le principal révélateur utilisé pour la détection des peptaïbols était le TDM (4,4'-tétraméthyl-diamino-diphénylméthane) (Brückner et Graf, 1983; Brückner et Przybylski, 1984b; Brückner *et al.*, 1985). Il permet de détecter les peptaïbols en dépôt de 10 µL à 2 mg/mL dans du méthanol. Néanmoins ce réactif présente des inconvénients pour une utilisation en routine : une préparation assez longue, une conservation limitée dans le temps et la révélation nécessite la pulvérisation de deux réactifs, l'hypochlorite de sodium, puis le TDM après avoir chauffé la plaque.

La sensibilité de l'orcinol pour la détection des peptaïbols est plus faible que celle du TDM avec les limites de détection à 4 mg/mL pour les mêmes volumes de dépôts. En revanche, sa préparation et son utilisation sont beaucoup plus simples, sa conservation plus longue dans le temps et la révélation ne nécessite qu'une seule pulvérisation.

Pour ces raisons, l'orcinol a été préféré pour rechercher la présence de peptaïbols dans les fractions lipophiles.

### II-2-2- Détection des peptaïbols par SM

La spectrométrie de masse est une technique analytique très sensible permettant d'obtenir des informations précises sur la structure et la masse moléculaire des produits analysés (Watson, 1985). Son principe repose sur la désolvatation et l'ionisation de l'échantillon induite par des sources d'énergie électronique. Cette ionisation va produire des ions qui vont être détectés et analysés (Niessen, 1999).

Pour l'étude des peptaïbols, nous avons utilisé la technique d'ionisation par nébulisation de type électrospray (Electrospray Ionization, ESI). L'échantillon est nébulisé sous forme de gouttelettes chargées par l'application d'un champ électrique de haut voltage sur le flux entrant. L'ionisation par électrospray permet ainsi de conserver les ions formés intacts, qui vont pouvoir être détectés sous diverses formes mono ou multichargées. Les ions générés dans la source sont ensuite analysés en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ).

Un analyseur à trappe d'ions (TI) couplé à l'électrospray (ESI) a été utilisé pour étudier les peptaïbols. En ESI-TI, les ions produits par l'ionisation en mode Electrospray sont piégés dans la trappe d'ions et éjectés selon leur rapport  $m/z$ . L'intérêt de ce type d'analyseur est de pouvoir piéger un ion déterminé (ion parent) et de réaliser sa fragmentation par l'application d'un impact ionique sous l'influence d'un flux d'hélium. Les différences de masse observées entre l'ion parent et ses ions fils vont pouvoir caractériser un groupement chimique et les ions fils obtenus par fragmentations successives (SM<sup>n</sup>) correspondent à un seul et unique composé.

### Paramètres d'analyses ESI-SM

Les fractions sont analysées en solutions méthanol 100% à une concentration de 0,5 µg/ mL en mode Fullscan positif à un débit de 3 µL/min. Les conditions expérimentales et instrumentales utilisées en mode ESI/MS ont été optimisées sur de l'alaméthicine commerciale (Sigma) :

Voltage du spray (kV) :	4,53
Gaz vecteur (U.A.) :	59,37
Gaz auxiliaire :	0,32
Voltage du capillaire (V) :	40,32
Température du capillaire (°C) :	265,80
Décharge Tube Lens (V) :	55,00
Voltage du multipole 1 (V) :	-4,32
Voltage de la lentille intermultipolaire (V) :	-16,12
Voltage du multipole 2 (V) :	-4,32

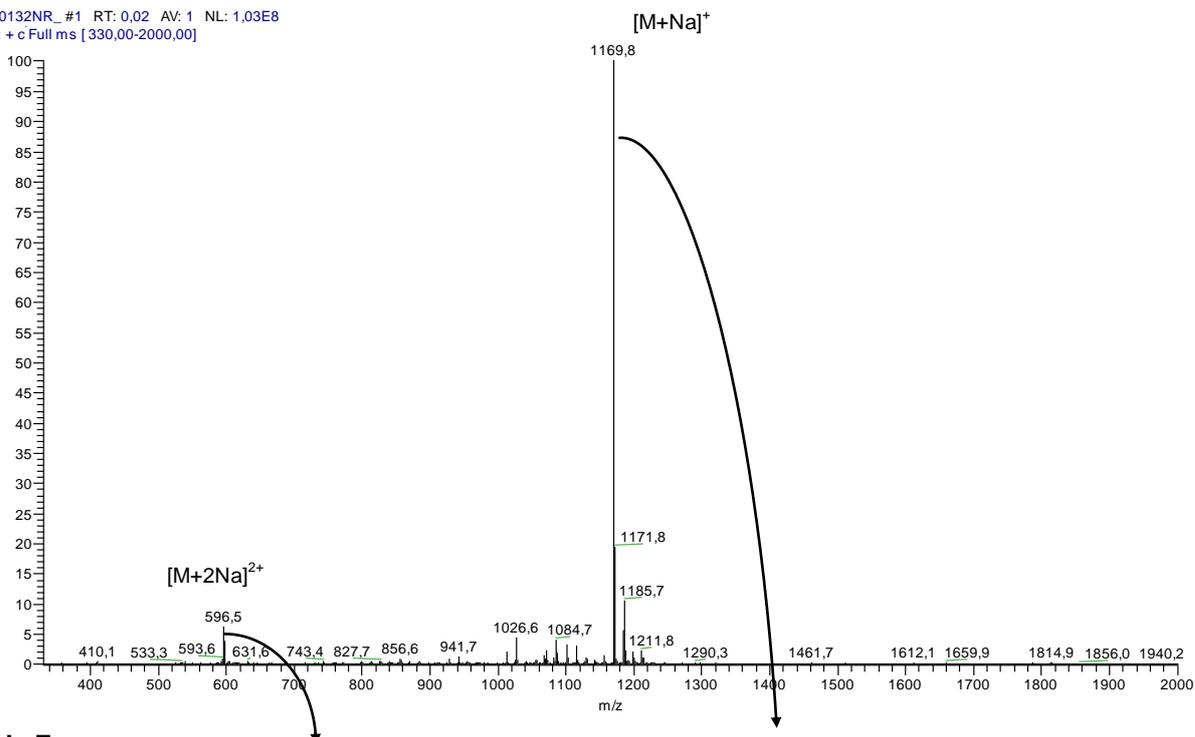
Le spectre de masse résultant de toutes ses intégrations correspond ainsi à l'abondance relative de l'ensemble des ions générés en fonction de leur rapport  $m/z$ . L'ion considéré comme majoritaire sera l'ion présentant une abondance relative de 100%.

Chaque ion observé dans les différentes fractions est analysé en mode Zoomscan afin de vérifier sa charge. En effet avec ce mode de balayage, à plus haute résolution, il est possible de voir si un ion est mono ou multichargé. Lorsqu'un ion est monochargé, il présente un profil isotopique où chaque ion isotopique va être distant de ses voisins par une différence de 1 ( $z=1$ ). Lorsque celui-ci est bichargé, la différence sera de 0,5 et la valeur de l'ion sera divisée par 2 ( $z=2$ ). Il est possible grâce à l'analyse Zoomscan de détecter la présence de peptaïbols dans les échantillons. En effet ces derniers présentent des profils isotopiques particuliers qui vont différer en fonction des familles.

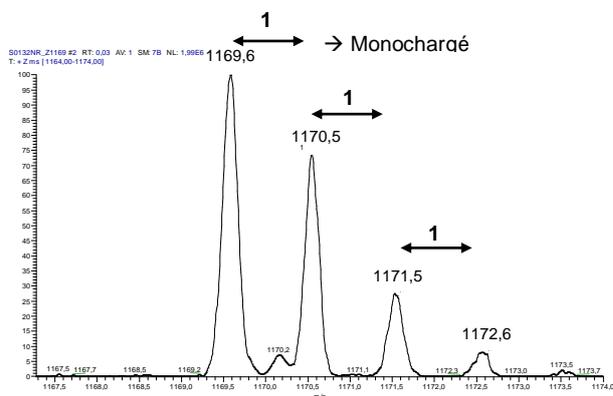
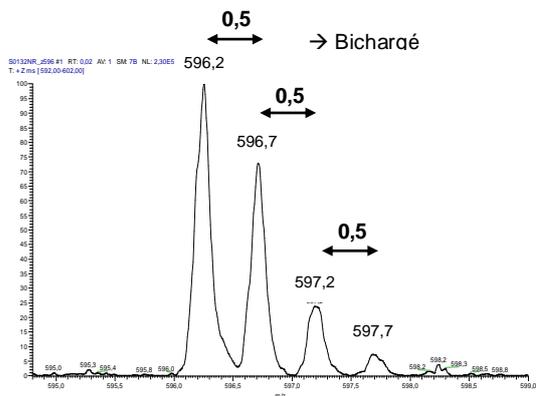
Pour les peptaïbols courts, le profil isotopique est constitué de quatre ions isotopiques distants de 1 et d'abondance relative décroissante du premier au dernier. Ainsi, si nous prenons comme exemple les trichobrachines A, peptaïbols courts à 11 résidus, l'ion monochargé adduit sodium en conditions neutres et en mode positif apparaît à  $m/z$  1169,8 (Figure 3-7, page suivante).

### Mode Fullscan

S0132NR\_#1 RT: 0,02 AV: 1 NL: 1,03E8  
T: + c Full ms [330,00-2000,00]



### Mode Zoomscan



### Profil isotopique théorique calculé (Isopro®)

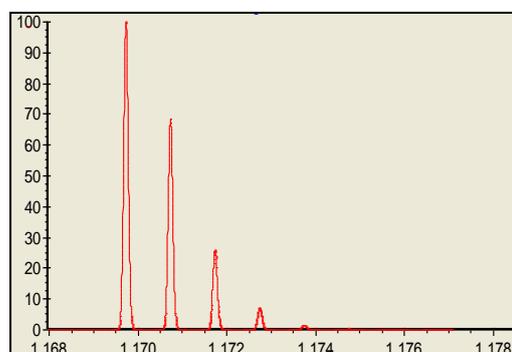
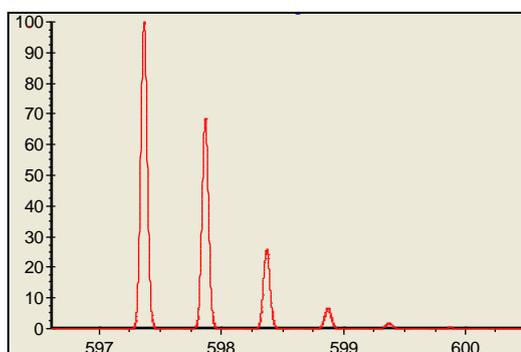


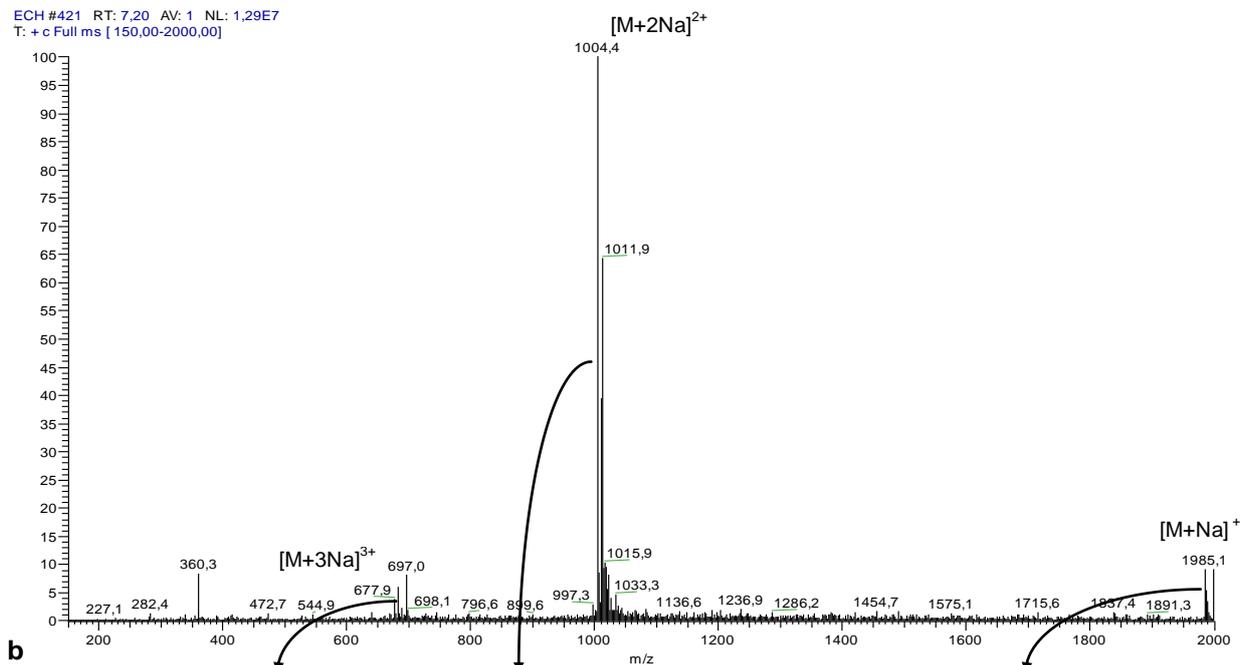
Figure 3-7 : Spectres de masse « Fullscan » et « Zoomscan » des trichobrachines (ESI<sup>+</sup>)

En mode Zoomscan, l'ion isotopique le plus abondant ( $m/z$  1169,5) correspond au premier des quatre ions et une différence de 1 est observée entre chaque ion. Le profil isotopique théorique calculé par le logiciel IsoPro<sup>®</sup> d'un peptaïbol analogue aux trichobrachines A, la trichorovine TV I-A, est similaire. L'adduit sodium  $[M+2Na]^{2+}$   $m/z$  596,5 est également visible, mais beaucoup moins abondamment que l'adduit sodium monochargé. En Zoomscan, le même type de profil isotopique est observé avec des différences de 0,5. L'ion majoritaire correspond au premier des quatre ions isotopiques confirmant la nature peptidique.

Pour les peptaïbols longs, le profil isotopique observé en mode Zoomscan est différent de ceux observés chez les peptaïbols courts. En effet, l'ion isotopique majoritaire chez les peptaïbols longs correspond toujours au deuxième ion comme le montre les spectres en mode Zoomscan de l'alaméthicine commerciale pour les adduits sodium monochargé, bichargé et trichargé (Figure 3-8).

**a**

ECH #421 RT: 7,20 AV: 1 NL: 1,29E7  
T: + c Full ms [ 150,00-2000,00]



**b**

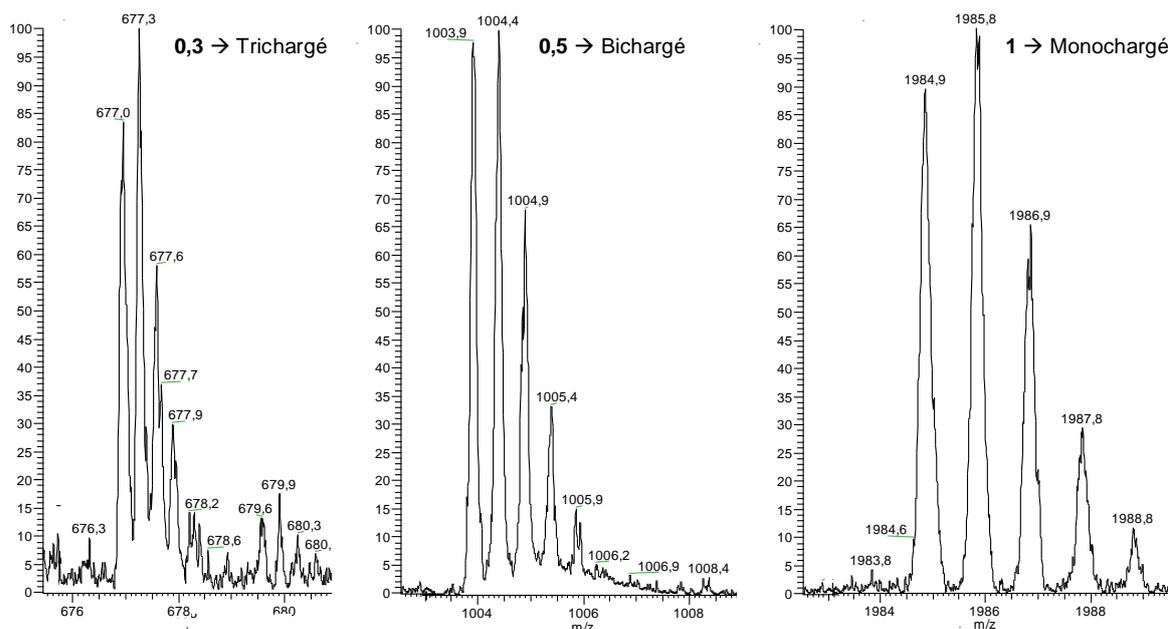


Figure 3-8 : Spectres de masse en mode Fullscan (a) et Zoomscan (b) de l'alaméthicine commerciale (ESI<sup>+</sup>)

Il est intéressant de noter que, contrairement aux trichobrachines pour lesquelles l'adduit monochargé apparaît majoritairement, pour l'alaméthicine, ce sont principalement les adduits bichargés qui sont observés.

## II-3- Séquençage des peptaïbols

Trois méthodes sont couramment utilisées pour déterminer les séquences des peptaïbols : le séquençage par analyse ESI-TI/SM, l'analyse de la composition en acides aminés par couplage CPG/SM et la résonance magnétique nucléaire (RMN).

Le séquençage des peptaïbols par fragmentation en spectrométrie de masse à trappe d'ion est une méthode sensible et rapide, analogue à la dégradation d'Edman. Elle a l'avantage de pouvoir être utilisée sur des mélanges peptidiques microhétérogènes. Néanmoins, elle ne permet pas la distinction d'isomères d'acides aminés comme les Leu/Ile et Val/Iva.

Concernant l'étude par CPG/SM, le mélange d'acides aminés issu de l'hydrolyse acide des peptaïbols est analysé afin de déterminer la composition élémentaire en acides aminés. Cette méthode permet de détecter les différents acides aminés constituant le peptide étudié et d'apporter des informations sur la présence ou non d'isomères. Il est alors possible de distinguer la Val de l'Iva, la Leu de l'Ile et leur correspondants réduits Valol, Ivaol, Leuol et Ileol en fonction de leur temps de rétention et de l'analyse de leur spectre de masse. Par contre, en cas de mélange de deux isomères, il est impossible de déterminer leur localisation respective dans la séquence peptidique.

Enfin, la RMN va permettre d'accéder à la structure complète des peptaïbols. Néanmoins, cette dernière nécessite un haut degré de pureté de la molécule analysée, ce qui pose problème avec les peptaïbols qui peuvent correspondre à des mélanges microhétérogènes. De plus, elle nécessite une quantité suffisante de produit.

Dans notre cas nous utiliserons exclusivement la fragmentation ESI-TI/SM pour le séquençage des peptaïbols. Dans certains cas, le séquençage des peptaïbols sera complété par une analyse de leur composition en acides aminés par CPG/SM.

### II-3-1- Séquençage par spectrométrie de masse

Le piégeage de chaque ion dans la trappe d'ions puis l'application d'une énergie de collision permet la fragmentation du peptaïbol en plusieurs ions fils par rupture des liaisons peptidiques. Ces fragmentations, quelques soient les techniques d'ionisation employées, se font au niveau de l'épine dorsale des peptides constituée par la suite des liaisons peptidiques. Suivant les sites de coupure, une nomenclature a été établie pour définir les ions formés (Biemann, 1988) (Figure 3-9).

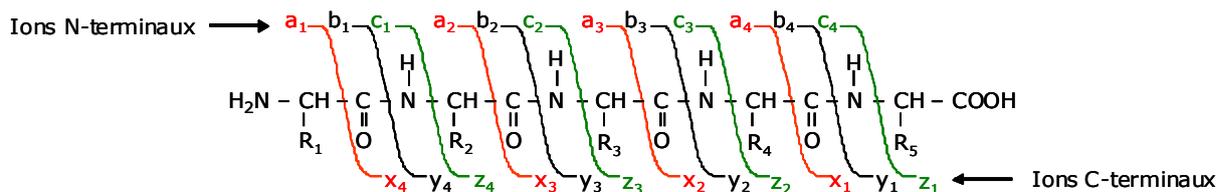
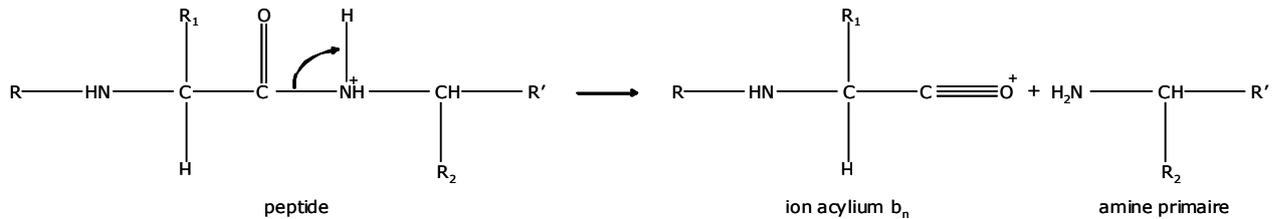


Figure 3-9 : Nomenclature de la fragmentation peptidique

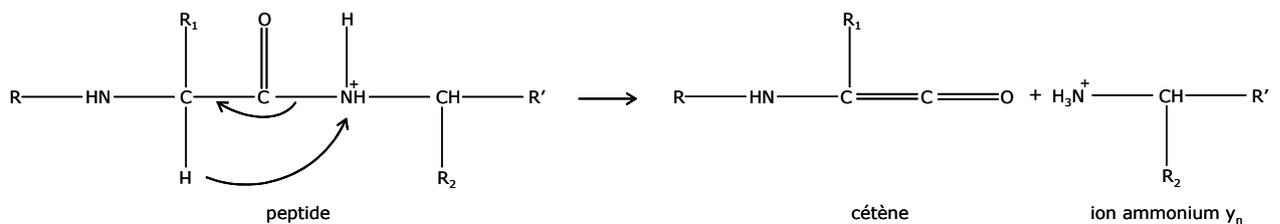
Trois différents types de fragments peuvent être obtenus en fonction de la localisation de la rupture : au niveau de la liaison peptidique, en amont ou en aval.

En milieu acide, les peptaïbols apparaissent sous la forme d'adduits proton et la fragmentation conduit principalement à deux types d'ions :

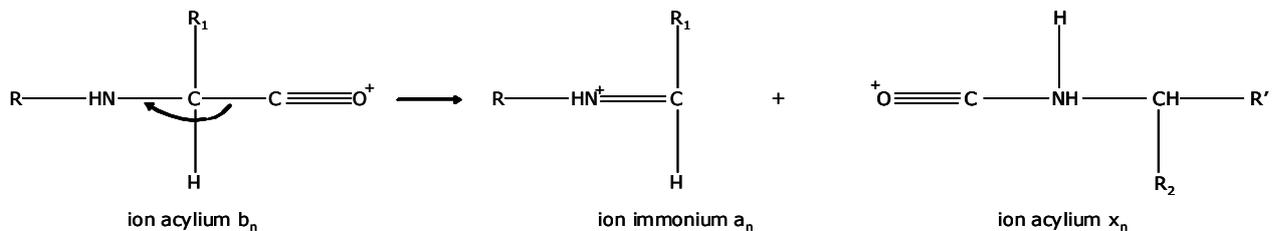
- Les ions acyliums notés  $b_n$ , qui correspondent au clivage direct de la liaison amide, contiennent le fragment N-terminal et se fragmentent à partir de l'extrémité C-terminale.



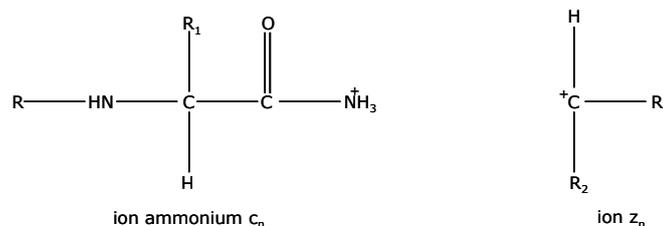
- Les ions ammoniums  $y_n$  nécessitent eux le transfert d'un hydrogène et vont contenir, à l'inverse, le fragment C-terminal et se fragmenter à partir de l'extrémité N-terminale.



De la même manière, les clivages en amont, au niveau de la liaison  $CH-CO$  de la chaîne carbonée sont aussi possibles mais moins fréquents. Ils vont donner deux types d'ions : les ions immoniums  $a_n$  en fragments N-terminaux et les ions acyliums  $x_n$  en fragment C-terminaux.



Enfin, les clivages en aval, au niveau de la liaison  $NH-CH$ , sont également possibles produisant des ions ammoniums  $c_n$  N-terminaux et des ions  $z_n$  C-terminaux :



Ces derniers sont beaucoup moins abondants que les ions acyliums  $b_n$  et ammoniums  $y_n$ .



## II-3-2- Fragmentations $SM^n$

Chaque étape de fragmentation va correspondre à la perte d'un résidu ou d'un segment de résidu. Les différences de masse obtenues entre les ions fragments consécutifs vont permettre de déterminer la séquence des peptaïbols et de remonter de l'extrémité C-terminale jusqu'à l'extrémité N-terminale en analysant les ions  $b_n/a_n$ . Les ions  $y_n$  vont permettre eux de séquencer les peptaïbols en sens inverse, de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale.

Nous avons travaillé exclusivement en milieu neutre, donc en fragmentation  $SM^n$  basée sur les ions adduits sodium. Les adduits sodium monochargés  $[M+Na]^+$  sont isolés dans la trappe d'ion puis fragmentés. Cette première fragmentation ( $SM^2$ ) produit toute une série d'ions fragments fils renseignant sur la séquence peptidique. L'ion fragment qui correspond au minimum de perte de résidu, par exemple  $[M-Lxol+Na]^+$  est à son tour isolé puis fragmenté en  $SM^3$ , générant de la même manière une série d'ions fragments  $SM^3$ . Le premier de ces nouveaux fragments correspondra à la perte d'un résidu. En poursuivant ainsi par fragmentation successive, il est possible de séquencer le peptaïbol en réalisant une filiation successive des résidus perdus à chaque étape de fragmentation.

Néanmoins, la fragmentation en  $SM^n$  devient limitante pour le séquençage lorsque le signal des ions isolés est insuffisant, rendant impossible la poursuite de la fragmentation. Deux solutions peuvent être employées pour terminer le séquençage et déterminer le début de séquence N-terminale. La première consiste à rechercher les ions ammoniums  $y_n$  correspondant à la perte des premiers résidus N-terminaux à partir du spectre de masse obtenu en  $SM^2$ . La seconde consiste en l'utilisation du CID (*collision induced dissociation*) au niveau de la source sur la totalité de l'échantillon.

## II-3-3- CID

L'utilisation du CID peut apporter des informations complémentaires en faisant apparaître des ions fragments caractéristiques d'une séquence peptidique particulière. Cette technique consiste à appliquer une énergie de collision suffisamment importante pour fragmenter complètement tout le peptide dès le départ, au niveau de la source.

Par contre, la filiation n'est plus possible puisque tous les fragments, de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale vont apparaître ensemble. De plus, l'énergie de collision est appliquée sur la totalité de l'échantillon, ce qui implique une certaine pureté de ce dernier. Ainsi si un échantillon contient deux peptaïbols, le CID va engendrer des ions fragments provenant des deux peptides et les distinctions entre les fragments provenant de chaque peptide respectif seront difficiles. Ce n'est pas le cas avec la fragmentation  $SM^n$  où la filiation est réalisée entre les différents résidus. Il est toutefois possible de réaliser de la fragmentation  $SM^n$  à partir de fragments obtenus par CID : on parle alors de CID- $SM^n$ .

L'intérêt de l'utilisation du CID réside aussi dans la possibilité d'accéder aux ions de faible abondance correspondant aux fragments N-terminaux. En effet, ils vont pouvoir être isolés dans la trappe d'ion et être fragmentés. Il est alors possible de déterminer la fin de séquence du peptide étudié.

Par exemple, pour les peptaïbols à 11 résidus, des ions fragments caractéristiques de l'extrémité N-terminale comme  $Ac-U_1-N_2$  ou  $Ac-U_1-Q_2$ , qui ne sont pas toujours observés lors des étapes successives de fragmentation  $SM^n$  sont visibles en CID et permettent de signer la terminaison de séquence.

Un problème de séquençage se pose également pour les nombreuses séquences microhétérogènes susceptibles d'être contenues chez les peptaïbols. La fragmentation permet de dégager les séquences présentant les ions fragments majoritaires. Par contre, les séquences dont les ions fragments ne seront pas assez abondants pour être fragmentés seront plus difficilement déterminées. Là encore, l'utilisation du CID peut aider le séquençage en faisant apparaître des ions fragments clés, peu visibles en  $SM^n$ , correspondant à la signature d'une filiation particulière et ainsi aider à compléter le séquençage.

## II-3-4- Etablissement des séquences

### II-3-4-1- Résolution de la microhétérogénéité : cascade de fragmentation ( $SM^n$ / CID- $SM$ ) - graphes de filiation

Un outil développé au Laboratoire est utilisé pour interpréter la fragmentation des peptaïbols (Mohamed-Benkada *et al.*, 2006). Il s'agit en fait de construire pour chaque ion fragment observé en ESI- $SM$ , un graphe de filiation faisant apparaître les fragments successifs obtenus, ceci en analysant les fragmentations  $\mathbf{a}_n$ ,  $\mathbf{b}_n$  et  $\mathbf{y}_n$ . Ci-après est illustrée la méthodologie utilisée pour l'élaboration des graphes de filiation.

Pour expliquer cette méthodologie, nous allons décrire un exemple de construction du graphe de filiation d'un peptaïbol court de *T. longibrachiatum*, représenté par la Figure 3-11, page suivante.

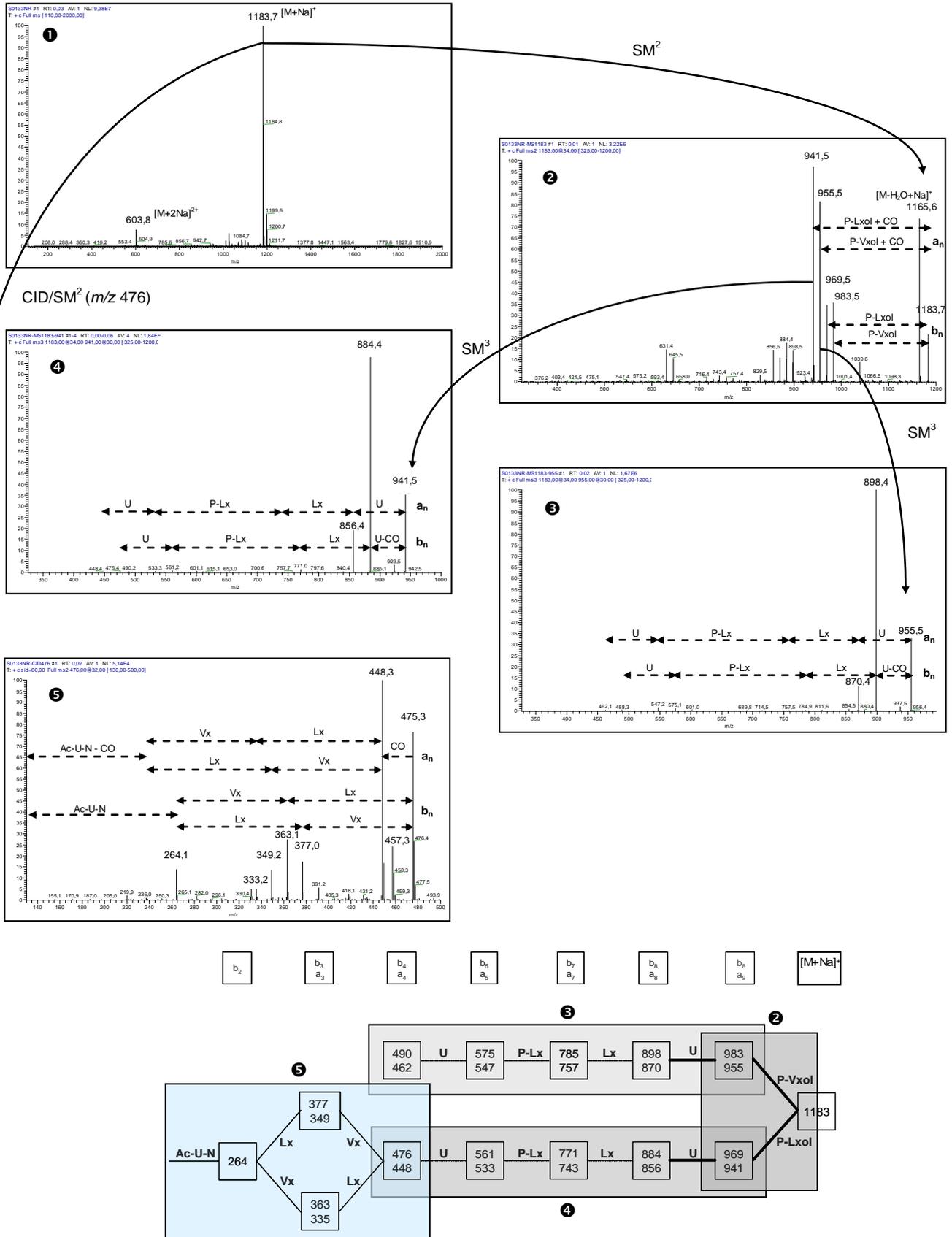


Figure 3-11 : Construction du graphe de filiation  $b_n/a_n$  de l'ion  $m/z$  1183

En condition neutre, l'ion observé correspond à l'adduit sodium  $[M+Na]^+$   $m/z$  1183 (❶). La fragmentation  $SM^n$  de cet ion va faire apparaître des fragments  $[b_n+Na-H]^+$  et  $[a_n+Na-H]^+$  à chaque perte de résidu à partir de l'extrémité C-terminale (❷, ❸ et ❹).

Quatre ions fragments principaux distants à  $m/z$  983, 969, 955 et 941 sont produits lors de la fragmentation de l'adduit sodium monochargé (❷). Il s'agit du clivage préférentiel entre l'Aib et la Pro, aux positions 9 et 10, qui génère des ions acyliums  $b_9$  et immoniums  $a_9$ . Ces ions résultent de la perte de la Pro et de l'amino-alcool C-terminal. En notant la différence entre l'adduit sodium et les différents fragments observés, il apparaît clairement l'existence, pour ce peptide, de deux terminaisons Pro-Vxxol et Pro-Lxxol traduites respectivement par la présence des ions  $b_9/a_9$   $m/z$  983/955 et 969/941. Avec cette première fragmentation, on peut donc déjà proposer deux séquences microhétérogènes, l'une débutant par un Vxxol, l'autre par un Lxxol.

Les fragments  $a_n$  présentent généralement, dans ces conditions, une intensité relative plus importante que leurs homologues  $b_n$  comme c'est le cas ici pour les ions  $m/z$  941 et 955 par rapport aux ions  $m/z$  969 et 983. Pour poursuivre la fragmentation, il est souvent nécessaire de travailler avec les fragments  $a_n$ .

De ce fait, la poursuite de la fragmentation indépendante des deux séquences microhétérogènes est réalisée à partir des ions immoniums  $a_9$  à  $m/z$  955 et 941 (❸ et ❹). Plusieurs ions fragments  $a_n$  et  $b_n$  sont produits dans les deux cas, permettant de déterminer les résidus des positions 9 à 5. La perte du résidu Aib apparaît nettement avec la présence des ions acyliums  $b_8/a_8$  respectivement à  $m/z$  898/870 (❺) et 884/856 (❻). Deux séquences majoritaires microhétérogènes peuvent être décrites : x-x-x-x-U-P-Lx-Lx-U-P-Vxol et x-x-x-x-U-P-L-L-U-P-Lxol.

L'analyse est poursuivie, de la même manière, de résidu en résidu pour compléter le séquençage. Lorsque les ions générés ne sont plus assez abondants pour être fragmentés en  $SM^n$ , une analyse en mode CID/ $SM^n$  peut être réalisée. C'est le cas ici pour l'ion  $b_4$  à  $m/z$  476, relatif à la séquence peptidique débutant par un Lxxol, qui est suffisamment abondant en CID pour être isolé et fragmenté (❻). Son analyse en CID/ $SM^2$  permet de déterminer deux terminaisons possibles pour la séquence dont l'amino-alcool est un Lxxol. Elles diffèrent par la position respective des résidus Vxx et Lxx en positions 3 et 4 : Ac-U-N-Lx-Vx-U-P-Lx-Lx-U-P-Lxol et Ac-U-N-Vx-Lx-U-P-Lx-Lx-U-P-Lxol.

La fragmentation  $SM^2$  peut apporter des informations complémentaires sur les séquences par l'analyse des ions ammonium  $y_n$ . La Figure 3-12 présente le graphe de filiation  $y_n$  de l'ion  $m/z$  1183 en fragmentation de type  $y_n$ , soit à partir de l'extrémité N-terminale.

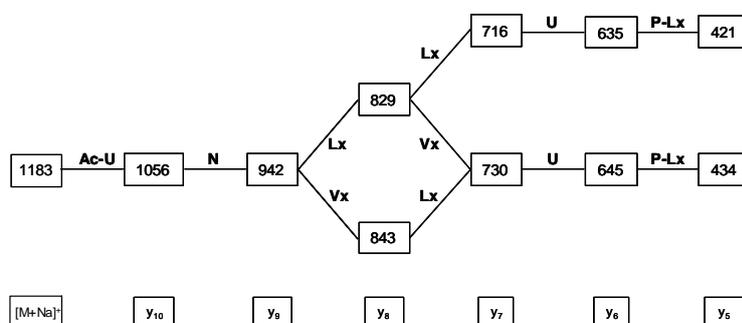
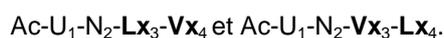


Figure 3-12 : Graphe de filiation  $y_n$  de l'ion  $m/z$  1183

Grâce à l'analyse des ions ammoniums  $y_n$ , il est possible de compéter et/ou de confirmer les différentes séquences N-terminales présentes qui traduisent la présence de microhétérogénéité.

L'observation de l'ion  $y_{10}$   $m/z$  1056 confirme l'acétylation de l'Aib en position 1 correspondant, à partir de l'extrémité N-terminale, à la perte du résidu Aib acétylé. L'ion  $m/z$  942 (fragment  $y_9$ ) traduit la perte du fragment Ac-Aib-Asn. Néanmoins, ce dernier est confondu avec l'ion immonium  $a_9$  à  $m/z$  941. Les ions  $y_8$   $m/z$  829 et 843 permettent de confirmer que les résidus Vxx et Lxx sont tous les deux présents en position 3 et donc qu'il y a deux terminaisons de séquences possibles, associées à l'ion  $y_7$  ( $m/z$  730) :



L'ion  $y_7$  à  $m/z$  716 est également observé en  $\text{SM}^2$ , affilié à l'ion  $m/z$  829, et permet de traduire la fin de séquence Ac-Aib<sub>1</sub>-Asn<sub>2</sub>-Lxx<sub>3</sub>-Lxx<sub>4</sub> relative à la séquence microhétérogène possédant un Vxxol (Figure 3-11,  $\odot$ ).

L'analyse complète de l'ion  $m/z$  1183 permet de présenter le graphe de filiation final (Figure 3-13).

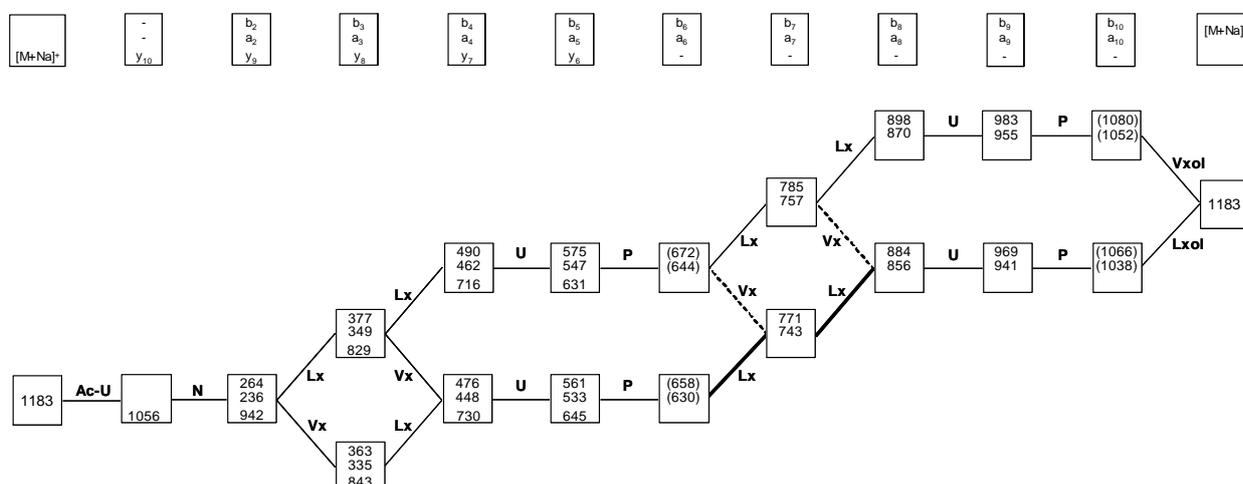


Figure 3-13 : Graphe de filiation final  $b_n$   $a_n$   $y_n$  de l'ion  $m/z$  1183

Nous procéderons de la même manière pour les autres peptaïbols à courtes séquences analysés dans cette étude, en présentant des graphes de filiation illustrant à la fois les ions issus de la fragmentation  $b_n/a_n$  et ceux issus de la fragmentation  $y_n$ .

## II-3-4-2- Séquences simples : séquençage par fragmentation ( $SM^2$ )

Contrairement aux peptaïbols courts, la microhétérogénéité est moins importante chez les peptaïbols à longues séquences. Cette spécificité permet dans la majorité des cas un séquençage des peptaïbols longs en une seule analyse, sans nécessiter la construction d'un graphe de filiation. Un exemple est présenté ci-après pour un des peptaïbols à 18 résidus isolé de la souche *T. harzianum* (Figure 3-14).

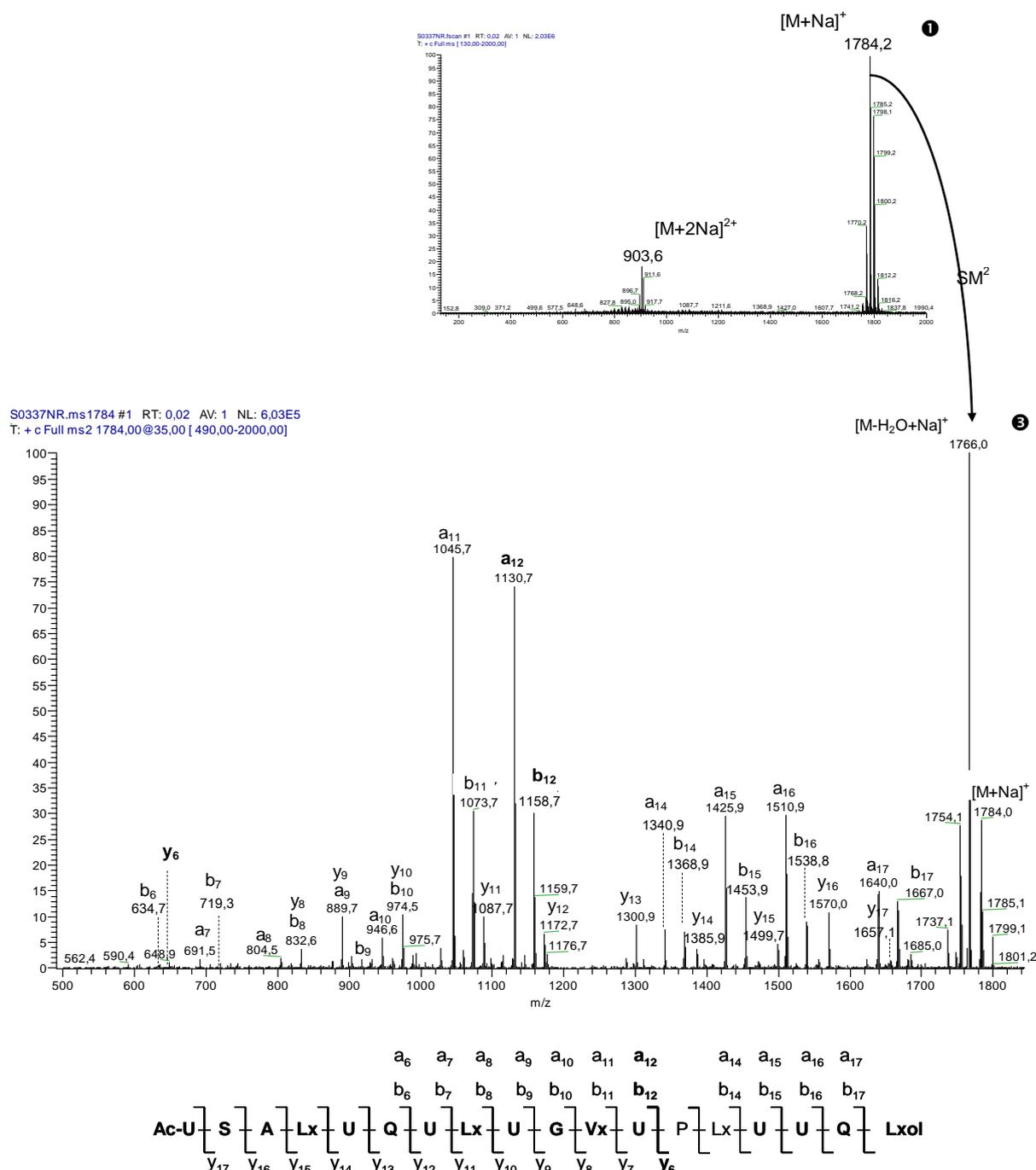


Figure 3-14 : Séquençage des peptaïbols longs en  $SM^2$

L'analyse en mode Zoomscan de l'ion  $m/z$  903 (2) confirme qu'il s'agit de la forme bichargée, correspondante de l'adduit sodium monochargé  $m/z$  1784. Compte tenu de l'abondance relative de l'adduit sodium monochargé (1), la fragmentation  $SM^2$  a été réalisée sur ce dernier (2). La détection des ions acyliums  $b_6$ - $b_{12}$ ,  $b_{14}$ - $b_{17}$  ainsi que leurs correspondants immoniums, et les ions ammoniums  $y_6$  à  $y_{17}$  permet de séquencer la totalité de ce peptaïbol : Ac-U-S-A-Lx-U-Q-U-Lx-U-G-Vx-U-P-Lx-U-U-Q-Lxol.

Remarque : Il est également possible d'analyser les séquences à partir de la fragmentation de l'ion bichargé qui génère des ions fragments compris entre des valeurs  $m/z$  600 à 1400. Ainsi, lorsque les deux types d'adduits sont présents et suffisamment abondants, il est intéressant de réaliser la fragmentation  $SM^2$  à la fois à partir des adduits sodium monochargés et bichargés, chacune des deux fragmentations apportant des informations communes et complémentaires. La fragmentation des ions monochargés est intéressante pour définir les ions acyliums de haute valeur  $m/z$  ( $b_{17}$ ,  $b_{18}$ ,  $b_{19}$ ) et/ou leurs correspondants immoniums, confirmant le début de séquence de l'extrémité C-terminale mais également les ions immoniums de hautes masses ( $y_{16}$ ,  $y_{17}$ ,  $y_{18}$ ). La fragmentation des ions bichargés permet, elle, une meilleure analyse des fragments de faible à moyenne masse relatifs aux régions centrales des peptaïbols.

## II-3-5- Analyse de la composition élémentaire en acides aminés par CPG/SM

Pour certains peptaïbols, une analyse de la composition en acides aminés par CPG/SM a été entreprise afin de différencier les résidus Vxx, Lxx et leurs formes réduites Vxxol et Lxxol. Cette technique d'analyse a été plusieurs fois employée chez les peptaïbols (Brückner *et al.*, 1985; Jaworski *et al.*, 1999; Jaworski et Brückner, 2001).

L'analyse de la composition en acides aminés des peptaïbols nécessite d'une part, de réaliser l'hydrolyse peptidique afin de libérer les différents acides aminés présents dans les peptaïbols, et d'autre part de dériver ces derniers pour les analyser en CPG/SM.

### Hydrolyse des peptaïbols

Les peptaïbols purifiés (1 à 2 mg) sont hydrolysés pendant 24 h à 110°C dans des ampoules scellées (5 mL) en présence de 200  $\mu$ L d'HCl 3M. Les hydrolysats sont alors récupérés, placés dans des flacons à sertir (2 mL) puis évaporés à sec au concentrateur.

Les acides aminés issus de l'hydrolyse des peptaïbols sont convertis en dérivés d'esters *N*-trifluoroacétyl isopropyliques suivant deux étapes successives :

- Estérification des acides aminés en esters isopropyliques  

$$NH_3^+-CHR-COOH + iProOH/HCl (3N) \rightarrow NH_3^+-CHR-COOiPro$$
- Trifluoroacétylation de la fonction amine de l'ester isopropylique pour former les dérivés d'esters *N*-trifluoroacétyl isopropyliques  

$$NH_3^+-CHR-COOiPro + CF_3COOH \rightarrow CF_3COO-NH-CHR-COOiPro$$

### Dérivation des acides aminés

Après évaporation, les acides aminés sont estérifiés en présence d'une solution d'HCl 3N dans l'isopropanol pendant 30 min à 100°C. Les esters isopropyliques d'acides aminés sont évaporés à sec à l'évaporateur rotatif puis acétylés par de l'anhydride trifluoroacétique pendant 30 min à 100°C. Les échantillons sont ensuite évaporés à sec puis repris dans le dichlorométhane pour être analysés en CPG/SM.

Ce type de dérivés est couramment utilisé en CPG/SM pour l'analyse des acides aminés et permet de distinguer facilement les isomères par analyse des spectres de masse obtenus lors de l'impact électronique (Leimer *et al.*, 1977; Dallakian et Budzikiewicz, 1997). Prenons le cas de la Leu et de l'Ile, ces isomères sont différenciables l'un de l'autre compte tenu d'une part de leur comportement chromatographique (temps de rétention différents) et d'autre part, par l'analyse des spectres de leurs esters *N*-trifluoroacétyl isopropyliques respectifs après impact électronique. Leurs spectres de masse sont présentés page suivante (Figure 3-15, page suivante).

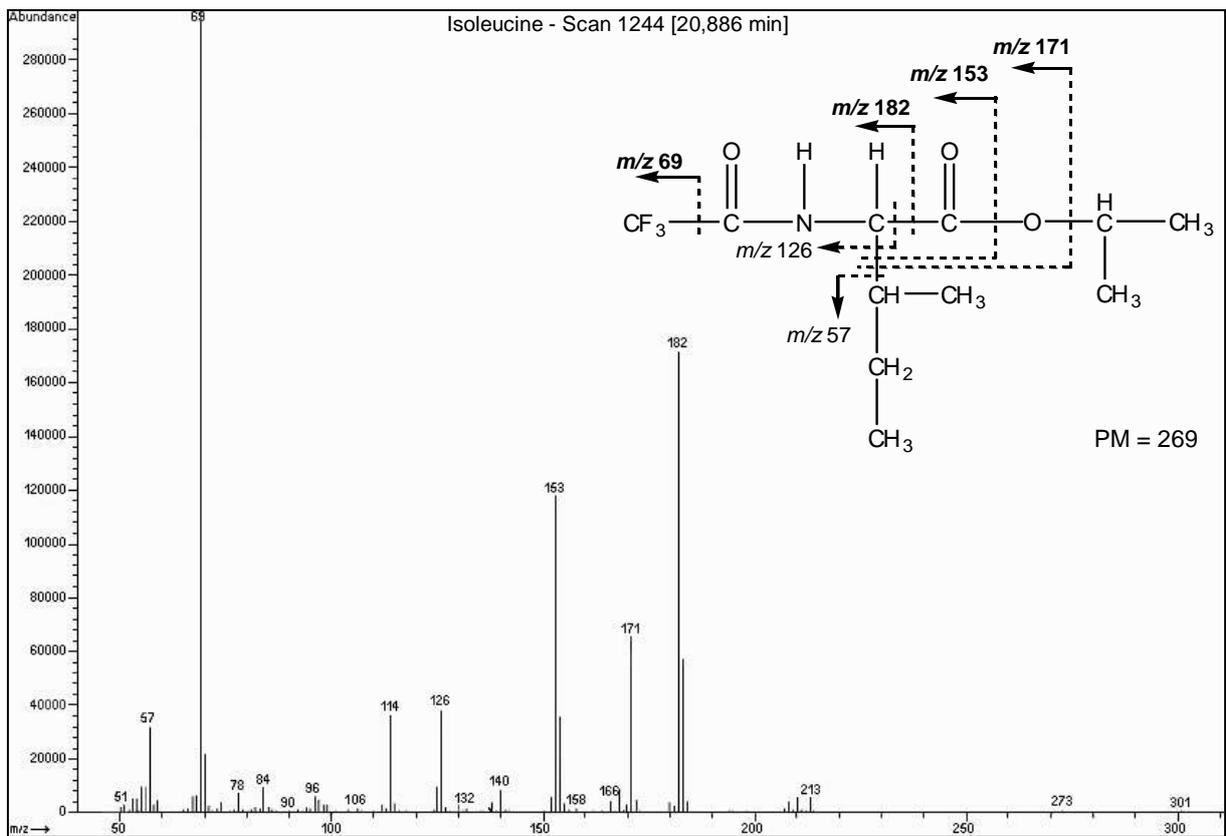
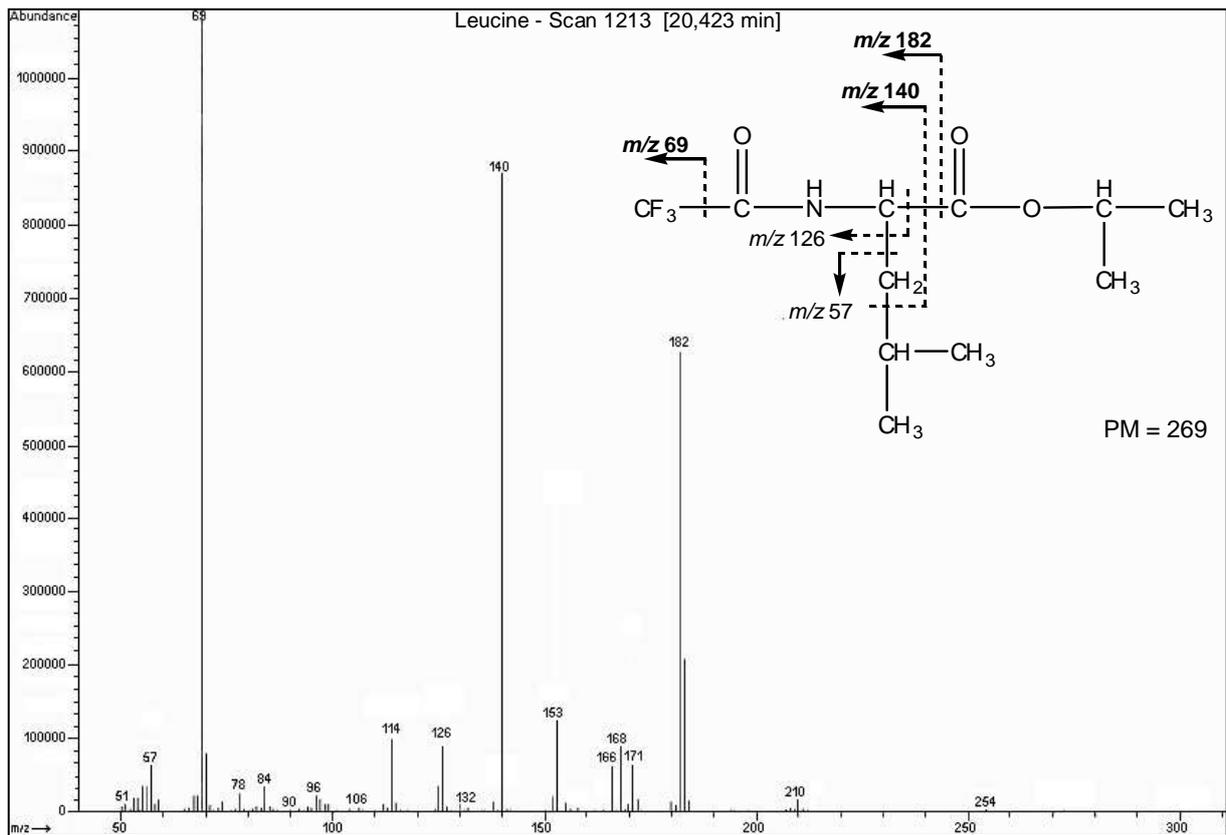


Figure 3-15 : Spectres de masse des esters N-trifluoracétyl isopropyliques de leucine et d'isoleucine

Les deux isomères présentent des ions communs à  $m/z$  182, 171, 153, 140, 126, 114, 69 et 57. L'ion  $m/z$  69  $[\text{CF}_3]^+$  correspond au pic de base pour ce type de dérivés. L'ion  $m/z$  182, abondant chez les deux isomères, correspond à la perte du fragment  $[\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2]^+$ .

Par contre, les deux isomères sont différenciables de par l'abondance des ions  $m/z$  140 et 153. Alors que pour le dérivé de la leucine, l'ion  $m/z$  140 (perte des groupements  $\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$  de l'extrémité C-terminale et  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  de la chaîne latérale) est abondant et domine l'ion  $m/z$  153. Le contraire est observé pour l'isoleucine, où ce dernier prévaut largement sur l'ion  $m/z$  140 et correspond à la perte des fragments  $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$  de l'extrémité C-terminale et  $\text{CHCH}_3\text{C}_2\text{H}_5$  de la chaîne latérale.

Ainsi l'analyse des spectres de masse des esters *N*-trifluoroacétyl isopropyliques est un outil efficace pour distinguer les isomères d'acides aminés. Afin de faciliter l'analyse CPG/SM, des acides aminés de référence (Asn, Gln, Pro, Aib, Val, Iva, Leu, Ile, Valol, Leuol, Ileol, Sigma) ont été dérivés en esters *N*-trifluoroacétyl-isopropyliques et analysés dans les mêmes conditions. Ceci a permis d'établir une liste de temps de rétention et de spectres de masse de référence.

### **Conditions d'analyse CPG/SM**

Les esters *N*-trifluoroacétyl isopropyliques d'acides aminés sont analysés sur une colonne capillaire apolaire Optima 5 MS (30 m x 0,25 mm, épaisseur de phase 0,25  $\mu\text{m}$ ). La programmation de la température de la colonne capillaire correspond à un palier isotherme à 50°C de 3 min puis 3°C/min de 50°C à 130°C et 10°C/min de 130°C à 280°C. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium (mode split). La détection est réalisée par impact électronique à 70 eV.

## II-4- Activités biologiques

L'évaluation pharmacologique des peptaïbols a été réalisée en se basant sur différents tests biologiques : neuroactivité sur larves de diptères, tests comportementaux sur souris, cytotoxicité sur lignée cellulaire cancéreuse humaine et tests antimicrobiens. Les motivations du choix de ces activités sera exposé dans la suite de ce travail.

### II-4-1- Toxicité aiguë sur larves de diptères

Le test de toxicité aiguë sur larves de diptères dérive de celui décrit par Zlotkin (1971) qui concernait l'évaluation de la toxicité des venins de scorpions. Ce test permet d'évaluer le caractère neurotoxique d'une molécule, après injection, par l'observation des symptômes provoqués. Est définie comme active toute molécule entraînant une contraction ou une relaxation d'un minimum de 5 s.

L'absence de tout symptôme sur une durée de 10 min est considérée comme une réponse négative. La dose injectée est fonction de la masse de la larve (1 µL pour 10 mg de larve). Généralement la masse moyenne varie entre 70 et 80 mg, donc la dose à injecter sera de 7 à 8 µL. Néanmoins, avant toute injection, une masse moyenne est calculée sur une dizaine d'individus.

Lorsqu'un extrait est considéré comme actif, la concentration minimale active (CMA) est mesurée par des dilutions successives du produit dans l'eau. Pour chaque concentration, trois larves sont testées, le produit est considéré comme inactif à partir du moment où plus aucune paralysie n'est observée.

#### Mode opératoire

Les larves utilisées appartiennent à l'espèce *Phormia terrae nova*. Elles sont communément utilisées comme appât pour la pêche et sont vendues à leur dernier stade larvaire (III), juste avant le stade imago précédant leur métamorphose en pupe ou nymphe. Elles sont conservées à 4°C entre 10 et 15 jours après l'achat. Le DMSO est utilisé à raison de 20% pour permettre une solubilisation du produit dans la solution aqueuse. Cette concentration n'induit aucun effet néfaste sur les larves et correspond ainsi au témoin négatif. Le premier test se fait la plupart du temps à une concentration de 100 µg de produit par µL de solution aqueuse à 20% dans le DMSO et par 10 mg de larves, lorsqu'il s'agit d'un extrait brut. Pour des échantillons plus purifiés, les concentrations peuvent être diminuées par 2. Le produit est injecté au niveau du dernier segment abdominal de la larve face dorsale à l'aide d'une micro-seringue de précision, dont l'aiguille hypodermique est biseautée. Une injection est réussie si l'animal continue de bouger au bout de l'aiguille et avant administration de la solution à tester. Dès la fin de l'injection, le chronomètre est déclenché et l'apparition des symptômes notée.

### II-4-2- Test comportemental chez la souris

Les tests comportementaux ont été réalisés au laboratoire de Pharmacologie de la faculté de Pharmacie de Nantes sur des souris Swiss Eops. Ces tests consistent, après injection par voie intra péritonéale des peptaïbols, en l'observation de l'évolution du comportement de l'animal au cours du temps. Différents paramètres sont contrôlés au cours de l'expérience comme la température corporelle, la motilité, la démarche, l'activité spontanée et l'activité respiratoire.

#### Mode opératoire

Dès leur arrivée les souris sont mises au repos pendant 4-5 jours pour les acclimater avant le début des tests. L'animal choisi pour l'expérience est pesé et sa température corporelle est mesurée par sonde anale. Les injections sont réalisées par voie intra péritonéale avec un volume maximum de 500 µL pour une souris de 20 g.

La concentration de départ pour nos tests était de 20mg/kg d'animal soit en moyenne 0,4 mg pour une souris de 20 g. Les échantillons à tester sont solubilisés dans l'éthanol à raison de 16 mg/mL puis dilués au 1/20 dans du sérum physiologique pour obtenir une concentration finale de 0,8 mg/mL. Un témoin éthanol est préparé (5% dans du sérum physiologique).

Après injection de l'échantillon, le comportement de l'animal est observé et comparé à celui de l'animal témoin. Selon l'activité des produits testés des doses à 20 ; 10 ; 5 et 1 mg/kg peuvent être réalisés.

## II-4-3- Cytotoxicité sur cellules KB

L'activité cytotoxique a été étudiée sur cellules KB par le test au MTT. Ce test a déjà été décrit dans la Partie 2 de ce mémoire lors de l'évaluation pharmacologique de l'acide 4-Me-6,8-16:2 (cf. Partie 2, page 75).

## II-4-4- Activité antibactérienne

Les tests antibactériens ont été réalisés au laboratoire de Bactériologie de la faculté de Pharmacie de Nantes. L'activité antibactérienne des peptaïbols a été étudiée sur les souches bactériennes ATCC *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 et *Enterococcus faecalis* 19433. Le choix de ces espèces permet de tester l'activité bactérienne sur des souches cliniques pathogènes à Gram positif et négatif. L'activité antibactérienne est observée directement et permet de visualiser la concentration minimale inhibitrice (CMI) des produits actifs.

### Mode opératoire

Pour chaque souche testée, une suspension bactérienne est préparée à partir d'une culture de 18 h à 0,5 Mac Farland ( $10^8$  bactéries/mL). Chaque suspension est ensuite diluée au 1/100 dans du bouillon Mueller Hinton (MH) pour donner une concentration finale à  $10^6$  bactéries/mL. Les différents produits à tester sont solubilisés dans de l'éthanol à raison d'une concentration de 10 mg/mL puis dilués au 1/25 dans du bouillon MH pour obtenir une concentration finale de 400 µg/mL. Un témoin est réalisé avec une solution d'éthanol à 4% dans le milieu de culture qui correspond au solvant des solutions des échantillons à tester. Les microplaques 96 puits sont alors préparées avec 100 µL de bouillon MH par puits. Les échantillons à tester (400 µg/mL) sont ajoutés au premier puits, correspondant à la plus forte concentration testée (100 µg/mL) puis une dilution de 1/2 en 1/2 puits par puits est réalisée avec agitation-refoulement à chaque dilution. Une rangée de puits est gardée pour le témoin éthanol. Après avoir effectué les dilutions, 100 µL de suspension bactérienne à  $10^6$  bactéries/mL sont ajoutés à chaque puits et la plaque est mise à incuber de 24 à 36 h à 37°C.

Après incubation, l'activité des différents échantillons est comparée par rapport au témoin éthanol, la concentration minimale inhibant totalement ou partiellement la croissance bactérienne est notée.

## II-4-5- Activité antifongique

Les tests antifongiques en milieu liquide ont été réalisés au Laboratoire de Parasitologie Médicale de la Faculté de Pharmacie de Nantes sur deux souches cliniques pathogènes : une levure, *Candida albicans* et un micromycète filamenteux, *Aspergillus fumigatus*. L'activité antifongique a été étudiée par le test fluorimétrique au bleu d'Alamar (Pagniez et Le Pape, 2001). Après incubation avec les échantillons à tester, la viabilité cellulaire a été mesurée directement par la capacité enzymatique des cellules à réduire le bleu d'Alamar ou resazurine en son homologue réduit, la resofurine. Ainsi lorsque les cellules fongiques sont viables, il y a réduction du bleu d'Alamar en resofurine, de couleur rose qui fluoresce à 590 nm. La viabilité cellulaire est ainsi dosée par spectrofluorimétrie : plus l'extinction de la fluorescence est importante et plus les échantillons présentent une activité antifongique forte.

## Mode opératoire

Les échantillons sont solubilisés dans de l'éthanol à raison de 10 mg/mL puis dilués (1/50) pour avoir une concentration finale de 200 µg/mL dans du RPMI 1640 supplémenté en acide morpholinopropanesulphonique (MOPS) (0,165M), glucose (2%) et antibiotiques. Pour chaque concentration testée, trois réplicats et un témoin éthanol à 4% sont réalisés.

### Activité *in vitro* anti-*Candida*

Les suspensions de *Candida albicans* sont réalisées dans le milieu RPMI ajusté pour donner une concentration finale de levures de  $10^3$  cellules/mL. Les microplaques 96 puits sont ensuite préparées avec 100 µL de suspension de *Candida albicans* et complétées par 100 µL de chaque produit à tester à leur différente concentration. Les plaques sont mises à incuber pendant 24 h à 37°C.

### Activité *in vitro* anti-*Aspergillus*

Les suspensions de conidies sont réalisées dans du milieu RPMI supplémenté en glucose (2%) et tamponné à pH 7 avec du MOPS (0,165M) pour obtenir une concentration finale de  $10^4$  cellules/mL. Les microplaques 96 puits sont préparées avec 100 µL de suspension de spores puis mises à incuber pendant 4 jours à 37°C pour permettre le développement mycélien d'*Aspergillus fumigatus*. Les produits à tester sont ajoutés à raison de 100 µL puits. Les plaques sont mises à incuber pendant 48 h à 37°C.

### Mesure de la concentration minimale inhibitrice

La viabilité cellulaire est évaluée après 4 h d'incubation avec du bleu d'Alamar (10 µL). L'intensité de la fluorescence émise par la resorufine à 590 nm est mesurée au spectrofluorimètre après une excitation à une longueur d'onde de 550 nm. Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique est calculé par la formule :  $[1 - (F_{\text{échantillon}}/F_{\text{témoin}})] \times 100$

L'activité des produits est exprimée par la concentration minimale inhibant 80% de la croissance fongique, déterminée par régression linéaire après moyenne des réplicats.

## P3-III- Peptaïbols de *Trichoderma* sp. : résultats obtenus

### III-1- Recherche des peptaïbols dans les fractions lipophiles

Les trois grandes fractions issues du fractionnement de l'extrait brut initial, identique à celui utilisé pour la recherche des lipides (cf Partie 2, « Séparation des lipides par classes »), à savoir les fractions dichlorométhane, acétone et méthanol, ont été analysées en CCM par révélation à l'orcinol.

Chez les deux souches, des peptaïbols ont été détectés dans les fractions acétone et méthanol sous forme de tâches blanchâtres. Dans les fractions acétone, les peptaïbols sont détectés après les glycolipides comme le montre la Figure 3-16 pour *T. longibrachiatum*.

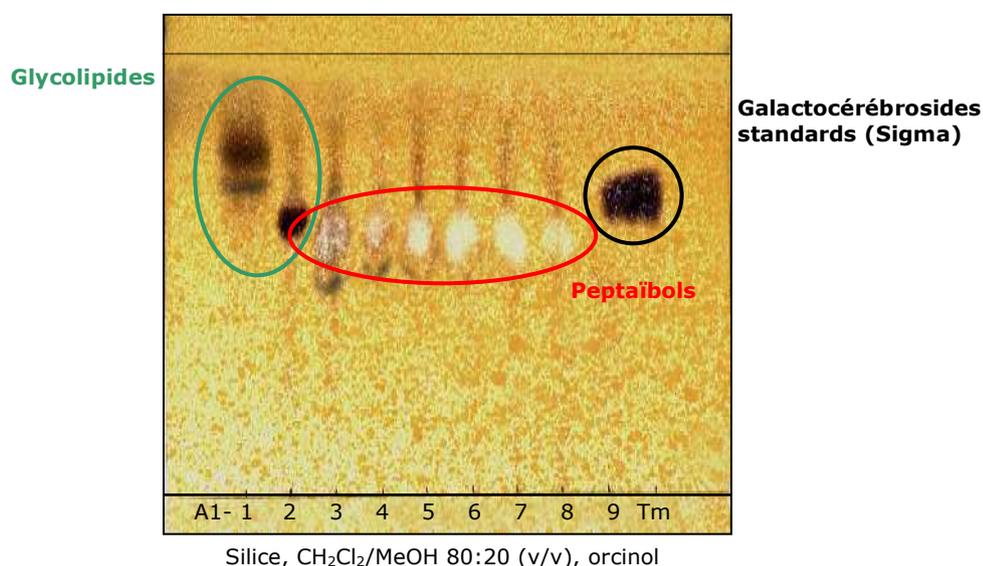
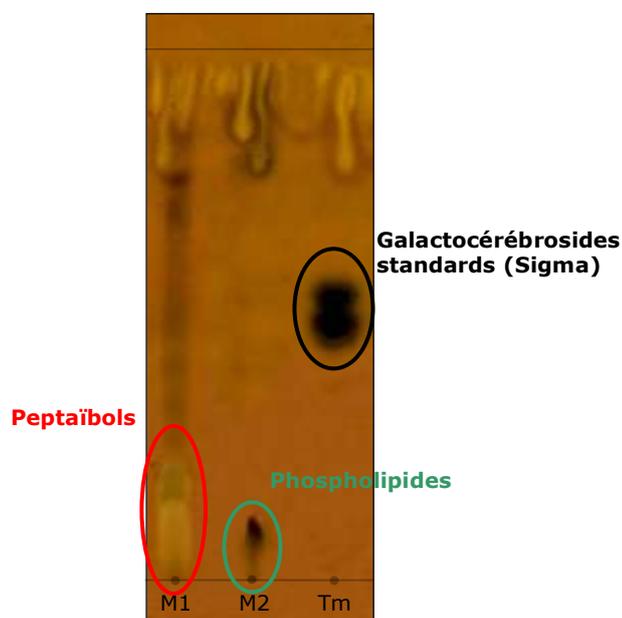


Figure 3-16 : CCM des fractions acétone de *T. longibrachiatum*

Dans les fractions méthanol, les peptaïbols ont également été observés, élués avant les phospholipides (Figure 3-17).



Silice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15 (v/v), orcinol

**Figure 3-17 : CCM des fractions méthanol de *T. longibrachiatum***

Pour chacune des deux souches de *Trichoderma*, les fractions acétone et méthanol, regroupées après analyse des plaques CCM révélées à l'orcinol, ont été analysées en SM afin de rechercher des ions caractéristiques des peptaïbols. Chez les deux souches, des peptaïbols ont été détectés aussi bien dans les fractions acétone que méthanol.

L'analyse par SM des fractions acétone et méthanol chez les deux souches a donc permis de confirmer la présence des peptaïbols, validant l'utilisation de l'orcinol comme « révélateur négatif » des peptaïbols.

## III-2- Obtention des peptaïbols et préanalyses par spectrométrie de masse

Comme nous venons de l'exposer, pour les deux souches, des peptaïbols ont été détectés dans les fractions acétone et méthanol issues de la chromatographie liquide initiale de l'extrait brut. Nous allons présenter dans ce chapitre les différentes étapes qui nous ont permis d'accéder, depuis l'extrait brut, aux différents peptaïbols produits par les deux souches de *Trichoderma* étudiées. Afin d'éviter les confusions entre les souches *T. longibrachiatum* et *T. harzianum*, l'annotation des fractions obtenues est complétée, respectivement des initiales TL et TH.

### III-2-1- *Trichoderma longibrachiatum*

Un extrait brut de 1260 mg a été obtenu après l'étape d'extraction de la biomasse fongique par le mélange dichlorométhane/méthanol. Les fractions acétone (TLA) et méthanol (TLM) provenant de la première chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice ont permis d'accéder aux différents peptaïbols produits par cette souche.

#### III-2-1-1- Fractions acétone

Neuf fractions, TLA1-1 à TLA1-9, ont été collectées lors de l'élution à l'acétone. Après analyse CCM, les peptaïbols étaient principalement élués dans les fractions TLA1-4 à TLA1-8 (cf. Figure 3-16, page 186). Ces fractions ont été regroupées pour donner une fraction, TLA-4, de 270 mg. Cette fraction a été purifiée par une deuxième chromatographie liquide sur une colonne ouverte de gel de silice (étape 2). Un gradient discontinu d'un mélange binaire dichlorométhane/méthanol a été réalisé. Les peptaïbols ont été élués avec le mélange dichlorométhane/méthanol 85:15 (v/v) correspondant à la fraction TLA2-5. Cent quatre vingt douze mg ont été obtenus, représentant, en poids, 70% de l'extrait déposé en tête de colonne et 15% de l'extrait brut.

### III-2-1-1-1- CLHP sur la fraction TLA2-5

La fraction TLA2-5 a ensuite été purifiée par CLHP. Compte tenu de la quantité de peptaïbols en mélange à séparer, nous avons travaillé en conditions semi-préparatives.

La fraction TLA2-5 a été éluée en injection préparative, en utilisant le même mélange binaire méthanol/eau 85:15 (v/v) pour la phase mobile (Figure 3-18). Le débit a été fixé à 5 mL/min et la quantité injectée à 5 mg. Les mêmes volumes ont été injectés à chaque injection (500 µL de solvant de la phase mobile).

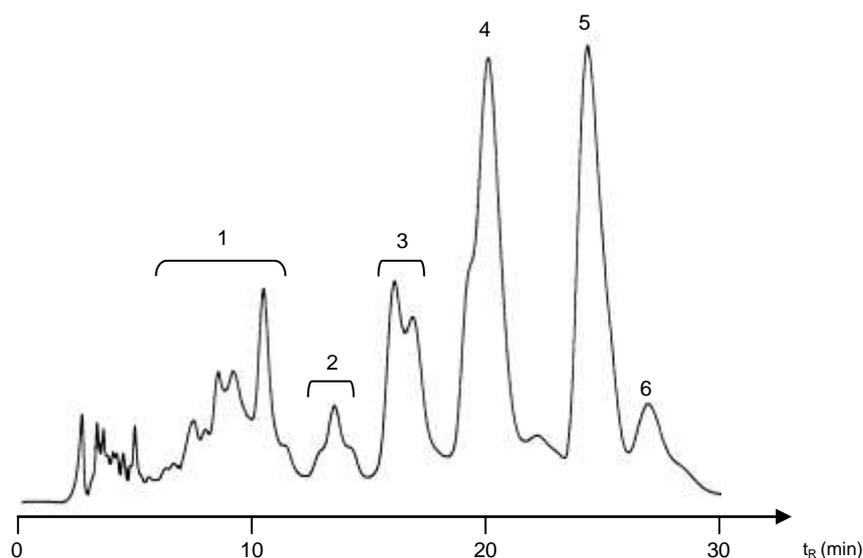


Figure 3-18 : CLHP semi-préparative de la fraction TLA2-5

Six fractions ont été recueillies correspondant aux grands pics visibles pour les fractions TLA3-2 à TLA3-6 et au massif de pics du début du chromatogramme pour la fraction TLA3-1. Les fractions obtenues ont été regroupées après chaque fractionnement, évaporées à sec et pesées. Le bilan massique de la CLHP préparative (étape 3) est présenté Tableau 3-17.

Tableau 3-17 : Bilan massique et rendement de l'étape de CLHP préparative sur TLA2-5

Fractions	Masse (mg)	%
TLA3-1	26,8	17,5
TLA3-2	6,7	4,4
TLA3-3	<b>28,6</b>	<b>18,7</b>
TLA3-4	<b>40,8</b>	<b>26,6</b>
TLA3-5	<b>30,0</b>	<b>19,5</b>
TLA3-6	12,3	8,3
Total	<b>153,2</b>	100
A2-5	<b>192</b>	
Rendement	80%	

On peut remarquer que la répartition pondérale des fractions est relativement similaire à la surface des pics observés en UV, indiquant sans doute une similitude de comportement allant dans le sens de la présence majoritaire de composés appartenant à une même famille chimique.

Ces fractions ont été analysées en SM, en perfusion. La Figure 3-19 illustre les spectres de masse obtenus en ESI-IT-SM pour chaque fraction.

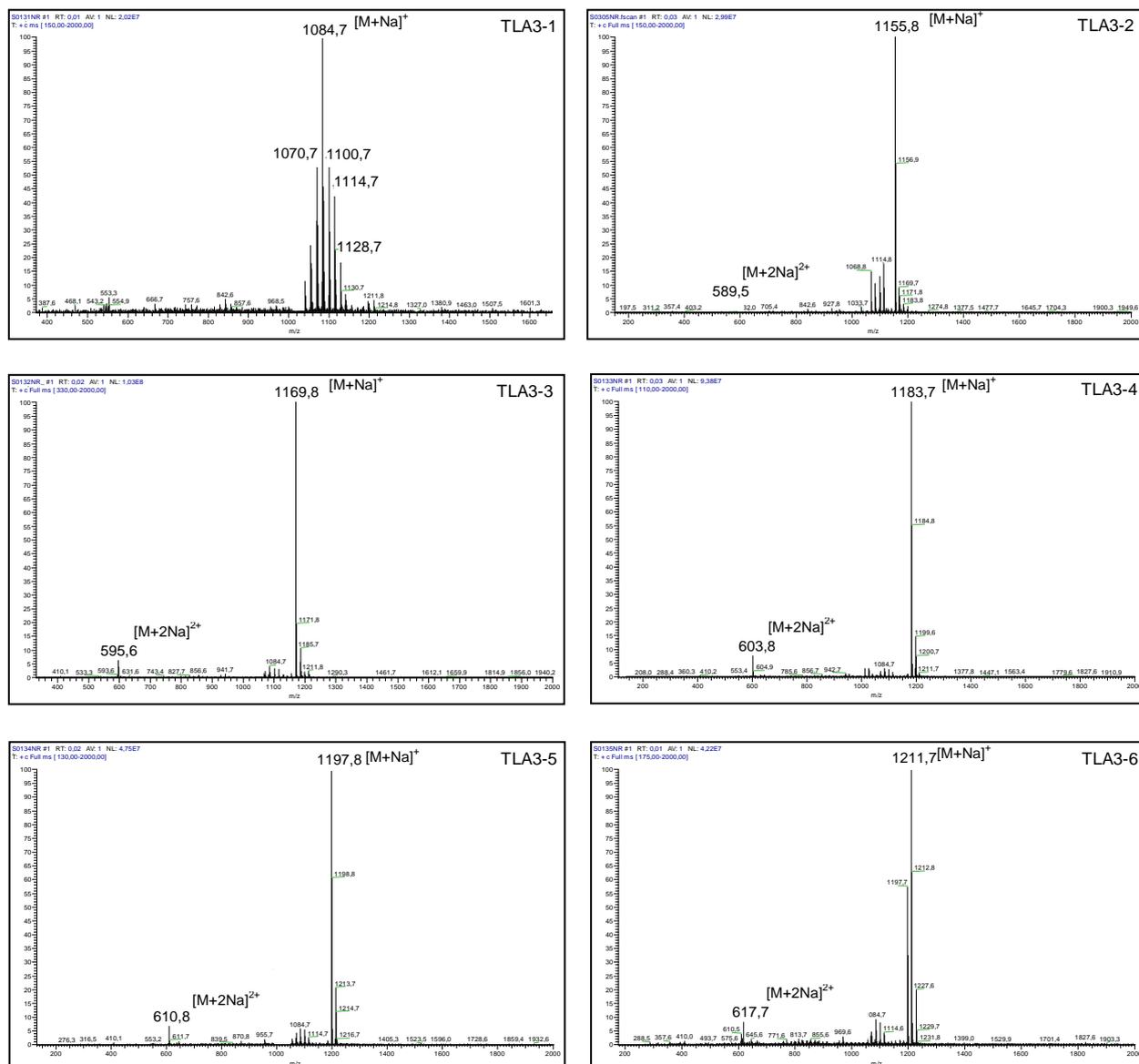


Figure 3-19 : Spectres d'ions totaux des fractions CLHP TLA3-1 à TLA3-6

Mis à part la fraction TLA3-1, chaque fraction correspond à un composé très majoritaire qui apparaît sous la forme d'un ion monochargé  $[M+Na]^+$ . L'étape de CLHP a permis de bien séparer les ions  $m/z$  1155, 1169, 1183, 1197 et 1211, présents respectivement dans les fractions TLA3-2 à TLA3-6. Ils semblent correspondre à des peptaïbols courts. Les spectres de masse sont propres avec peu, voir pas, de chevauchement d'une fraction à l'autre, ne nécessitant pas d'étapes supplémentaires de purification pour leur étude.

La première fraction (TLA3-1) correspond à un mélange assez complexe de produits (au moins 6 observés) dont les plus abondants est celui à  $m/z$  1084. Afin de les étudier, une nouvelle étape de purification a donc été nécessaire.

### III-2-1-1-2- CLHP sur la fraction TLA3-1

La fraction TLA3-1, trop complexe, a nécessité une deuxième étape de purification en CLHP préparative. Les conditions chromatographiques sont semblables à celles employées pour l'étape CLHP précédente, la différence concerne uniquement la phase mobile qui correspond à un mélange méthanol/eau 80:20 (v/v) (Figure 3-20).

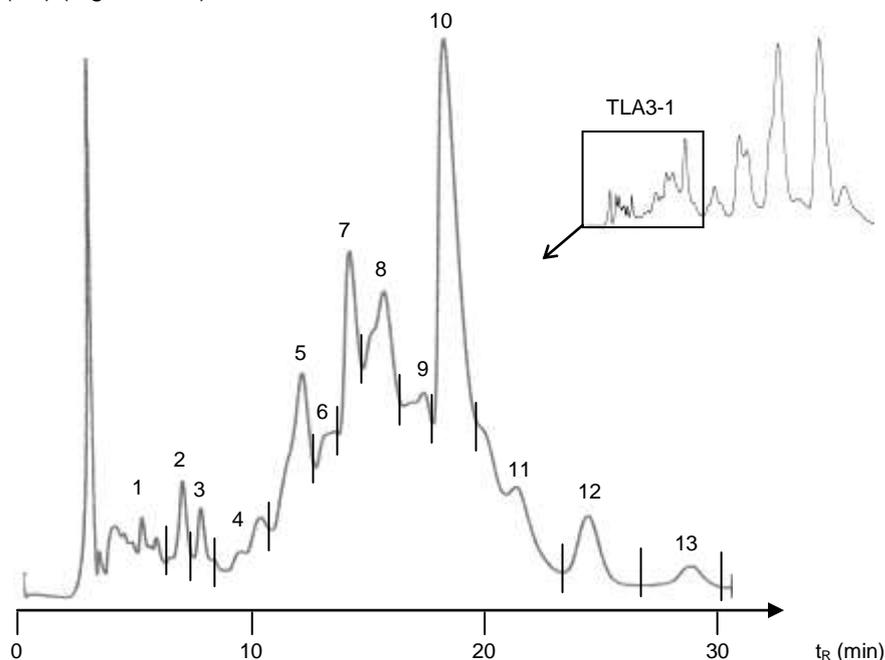


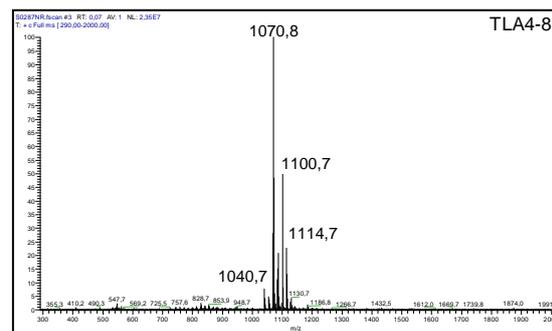
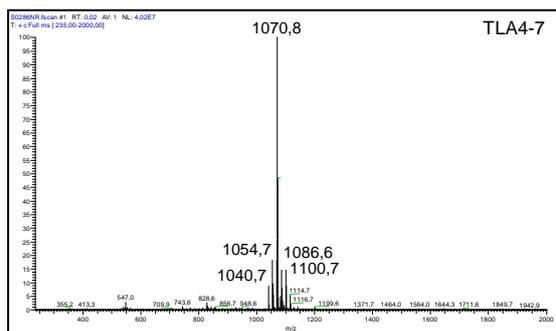
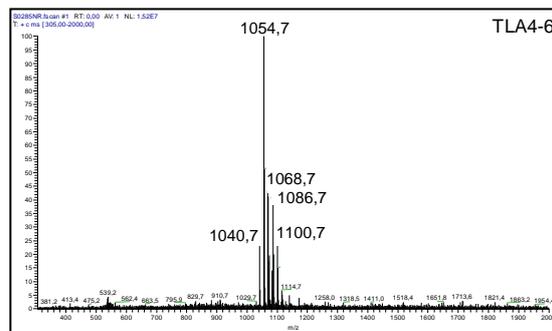
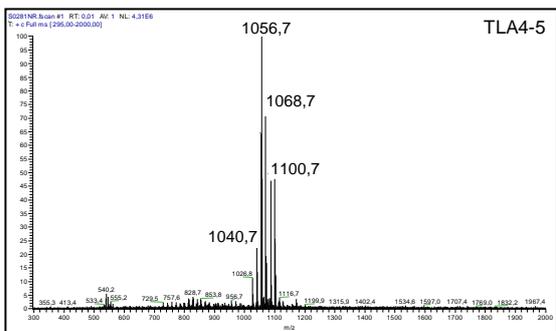
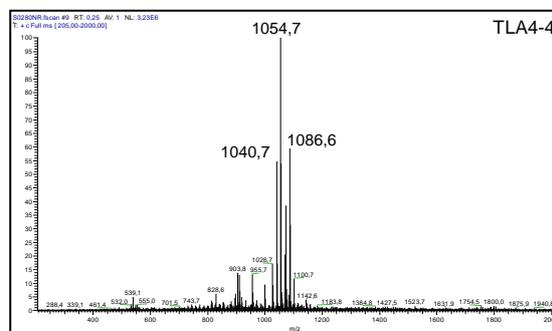
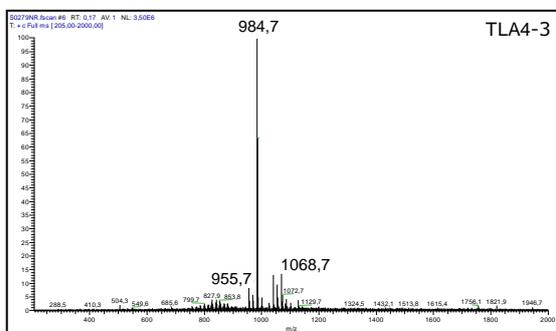
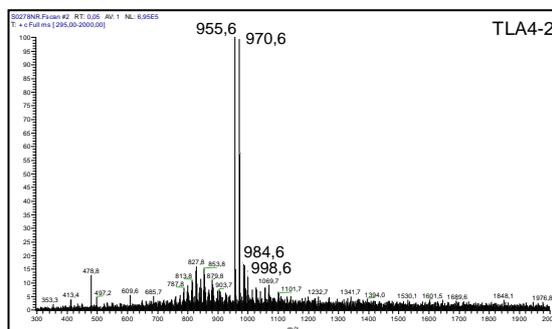
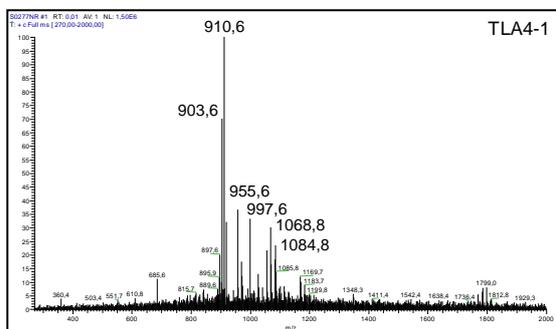
Figure 3-20 : CLHP semi-préparative de la fraction TLA3-1

D'après le profil chromatographique, la séparation des différents produits semble moins efficace que lors de l'étape de CLHP précédente. Néanmoins, 13 fractions (TLA4-1 à TLA4-13) ont pu être collectées dont les plus importantes correspondent aux pics d'absorption 8 et 10 (Tableau 3-18).

Tableau 3-18 : Bilan massique et rendement de l'étape de CLHP sur la fraction TLA3-1

Fractions	Masse (mg)	%
TLA4-1	1,3	6,5
TLA4-2	0,5	2,5
TLA4-3	0,2	1
TLA4-4	0,5	2,5
TLA4-5	1,5	7,5
TLA4-6	1,2	6
TLA4-7	1,7	8,5
TLA4-8	<b>4,6</b>	<b>23,1</b>
TLA4-9	1,2	6
TLA4-10	<b>4,9</b>	<b>24,6</b>
TLA4-11	0,8	4
TLA4-12	1,2	6
TLA4-13	0,3	1,5
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
Total	19,9	100
<hr/>		
TLA3-1	26,8	
Rendement	74%	

La qualité de la séparation par cette deuxième étape de CLHP préparative des différents produits contenus dans la fraction TLA3-1 est contrôlée par l'analyse des fractions TLA4-1 à TLA4-13 en spectrométrie de masse (Figure 3-21).



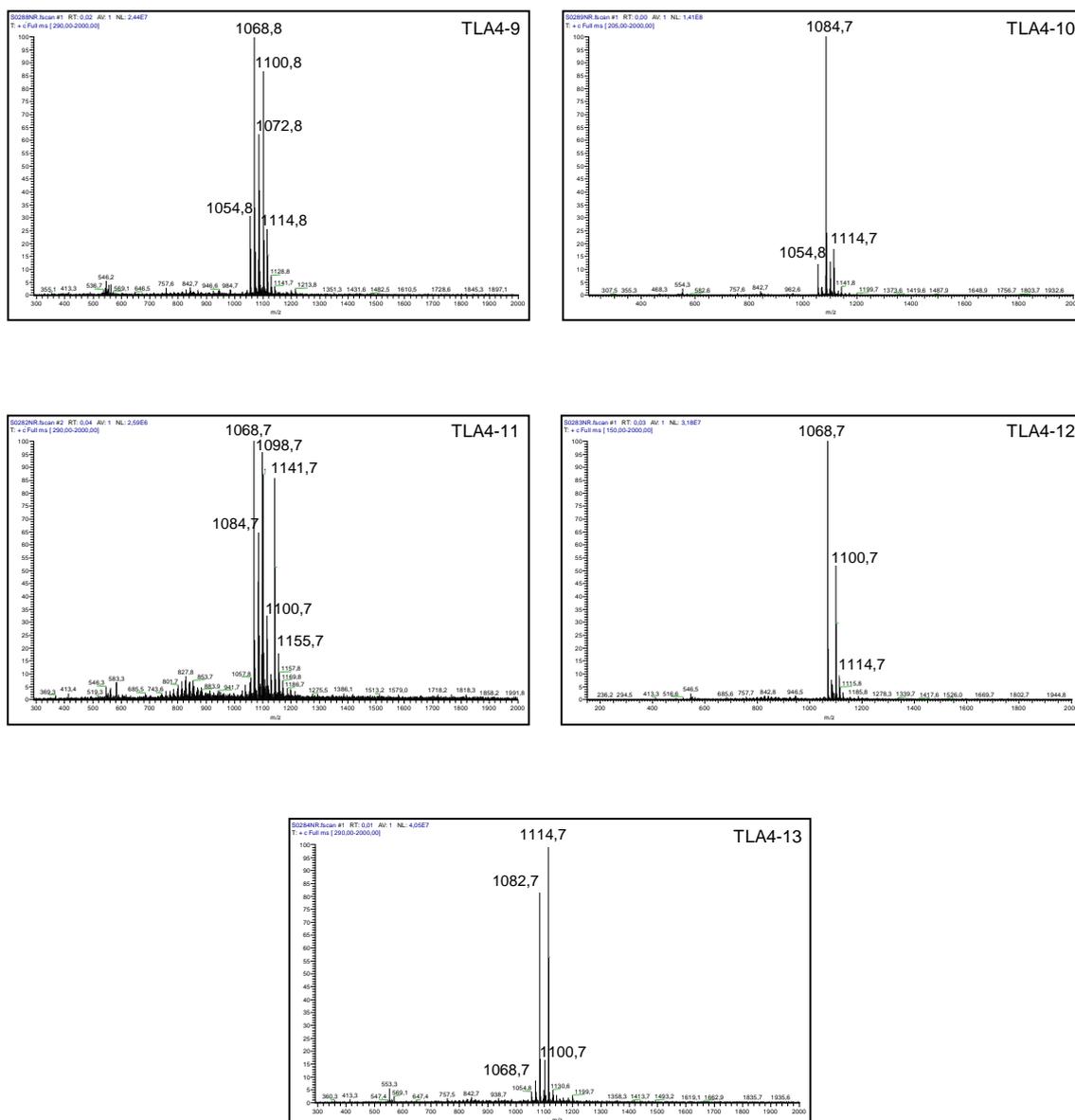


Figure 3-21 : Spectres d'ions totaux des fractions CLHP TLA4-1 à TLA4-13

Une grande hétérogénéité de produits est observée pour la plupart des fractions. Tous Les ions observés correspondent à des adduits sodium monochargés excepté les ions  $m/z$  903 et 910, présents sous forme bichargée (fractions TLA4-1 et TLA4-4).

A ce niveau, il est possible d'observer que les ions  $m/z$  903 et 910 correspondent à des peptaïbols longs. Les masses moléculaires déduites à partir des ions bichargés sont respectivement de 1760 et 1774 Da caractéristiques de peptaïbols à 18 résidus. L'analyse de ces peptaïbols sera présentée ultérieurement.

Il apparaît que si les ions observés dans les fractions TLA4-1 à 3 sont relativement bien séparés des autres ions, ceci n'est pas le cas pour les fractions qui suivent. En effet, de nombreux ions présentant des valeurs  $m/z$  différentes se chevauchent et se retrouvent mélangés dans la plupart des fractions TLA4-4 à 13. Néanmoins les capacités analytiques de la spectrométrie de masse à trappe d'ions devraient permettre d'étudier ces fractions sans séparation plus poussée.

### III-2-1-2- Fraction méthanol

Lors de l'élution au méthanol qui suit celle à l'acétone, deux fractions méthanol (TLM1 et TLM2) ont été récoltées. Une étape de purification sur colonne ouverte de gel de silice a été réalisée sur la première fraction (TLM1-1, 300 mg). Nous avons procédé de la même manière que pour la purification des peptaïbols contenus dans les fractions acétone, par chromatographie liquide sur phase silice en éluant la fraction TLM1-1 par à un gradient discontinu d'un mélange binaire de dichlorométhane/méthanol. Au cours de cette étape, 156 mg de peptaïbols ont été élués dans la fraction TLM2-5 correspondant au mélange dichlorométhane/méthanol 85:15 (v/v).

Cette fraction a ensuite subi une purification par CLHP en mode semi-préparatif. Les mêmes conditions que celles employées pour les peptaïbols présents dans les fractions acétone ont été utilisées.

Cinq fractions, TLM3-1 à TLM3-5, ont été récoltées de 18 à 36 minutes. Le profil chromatographique obtenu (Figure 3-22) montre deux pics majoritaires respectivement à 22 et 24 minutes.

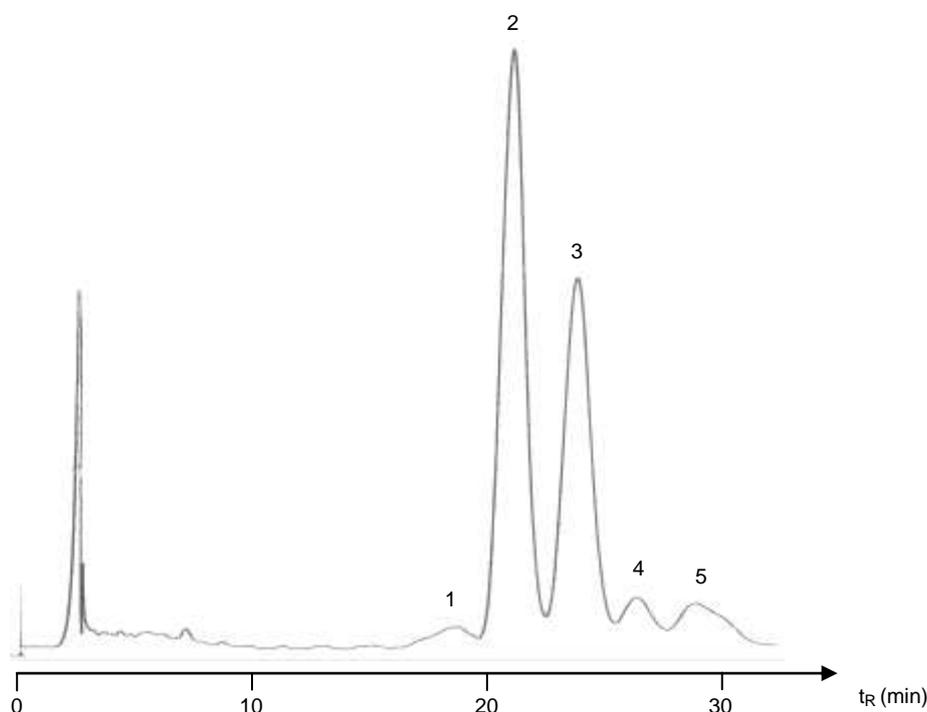


Figure 3-22 : CLHP semi-préparative de la fraction TLM2-5

D'après le profil chromatographique, les peptaïbols présents dans la fraction TLM2-5 présentent des temps de rétention différents de ceux isolés des fractions acétone. En comparant les deux chromatogrammes, nous remarquons que les peptaïbols courts, principalement présents dans les fractions acétone sont élués entre 10 et 24 min alors qu'ici, les peptaïbols le sont plus tardivement entre 18 et 36 minutes. Néanmoins une zone de chevauchement est présente entre 18 et 24 min. L'analyse des fractions en spectrométrie de masse nous permettra de déterminer la nature des peptaïbols présents dans ces fractions méthanol. Le bilan massique de l'étape 3 est présenté Tableau 3-19, page suivante.

Tableau 3-19 : Bilan massique et rendement de l'étape 3 de séparation par CLHP préparative

Fractions	Masse (mg)	%
TLM3-1	3,5	5,1
TLM3-2	26,9	38,8
TLM3-3	17,8	25,8
TLM3-4	7,1	10,3
TLM3-5	13,8	20
-----		
Total	69,1	100
-----		
TLM2-5	156	
Rendement	44%	

Les fractions les plus importantes (TLM3-2, TLM3-3 et TLM3-5) ont des masses comprises entre 13 et 27 mg. Le rendement de cette étape est beaucoup moins important que celui obtenu pour l'étape CLHP de la fraction acétone TLA2-5 (cf. Tableau 3-17, page 189). Les peptaïbols ne correspondent ici qu'à 44% de la fraction de départ (TLM2-5). Ce faible rendement peut s'expliquer par le fait que cette fraction contient des molécules autres que des peptaïbols tels que des phospholipides. Une première fraction que nous pouvons nommer TLM2-0, regroupant l'élution de 0 à 15 min, représente en effet, une masse de 46 mg. Les spectres de masse relatifs aux cinq fractions de peptaïbols sont présentés Figure 3-23.

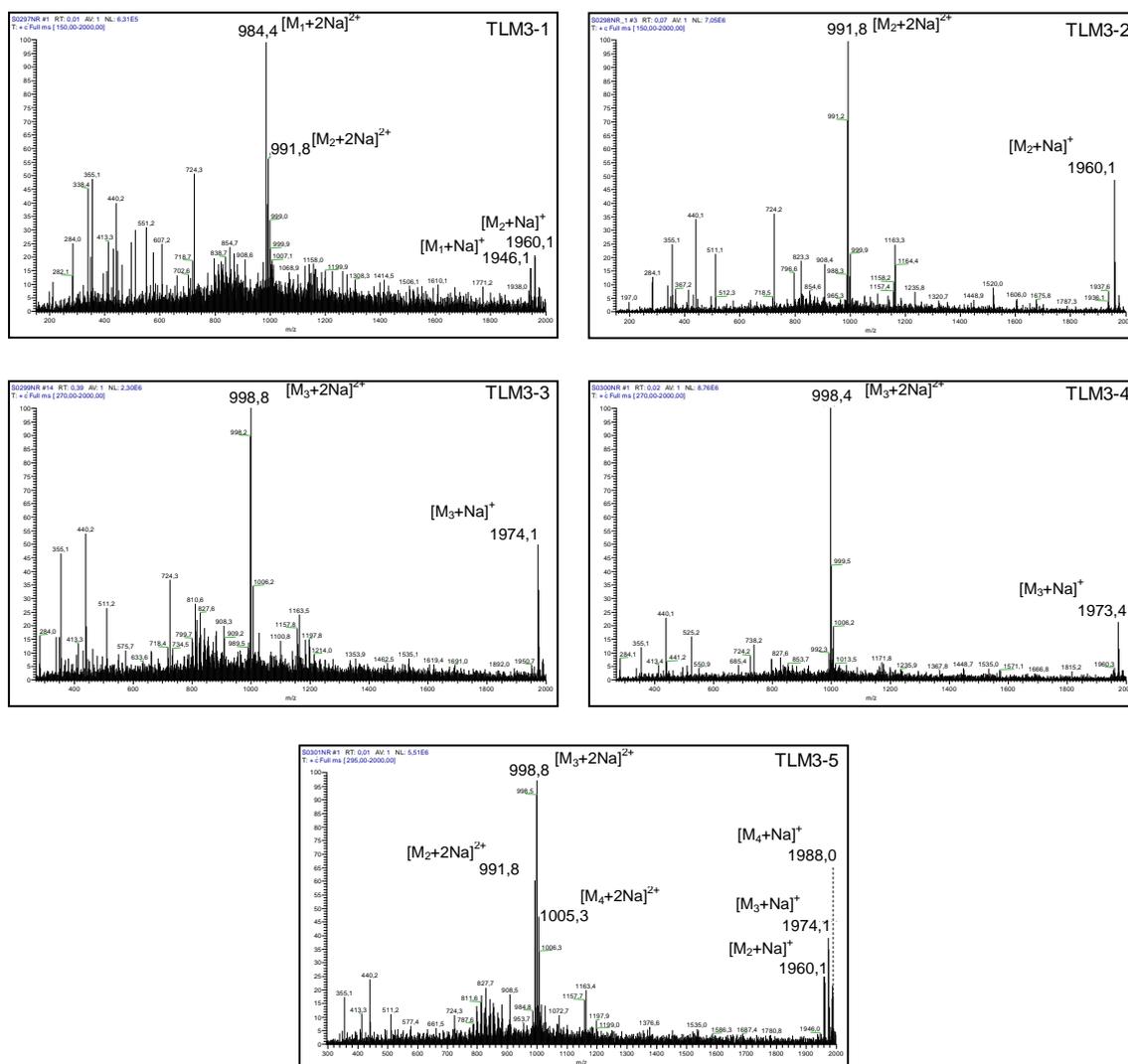


Figure 3-23 : Spectres d'ions totaux des fractions CLHP TLM3-1 à TLM3-5

Les ions observés en ESI-SM sont principalement des adduits sodium bichargés compris entre les valeurs  $m/z$  984 et 1005. Nous sommes ici en présence exclusivement de peptaïbols longs à 20 résidus, par comparaison des masses observées avec celles déjà décrites dans la littérature. Les peptaïbols longs, contrairement aux peptaïbols courts, ont la particularité d'être ionisés ici préférentiellement sous forme d'adduits sodium bichargés (comme c'est le cas pour les peptaïbols longs observés dans les fractions TLA4-1 et TLA4-4) dans les conditions d'analyses utilisées. Les ions adduits sodium monochargés correspondants, c'est-à-dire  $m/z$  1946, 1960, 1974, 1988, sont également présents mais moins abondamment et n'excèdent jamais 50% en intensité relative.

La qualité de la séparation est moins bonne que pour l'étape CLHP de la fraction TLA2-5. Le Tableau 3-20 résume les différents ions observés dans chacune des fractions et les poids moléculaires calculés.

**Tableau 3-20 : Ions observés des peptaïbols présents dans les fractions CLHP TLM3-1 à TLM3-5**

$[M+2Na]^{2+}$	$[M+Na]^+$	Fractions TLM3-				
		1	2	3	4	5
984	1946	■				
991	1960	■	■			■
998	1974			■	■	■
1005	1988					■

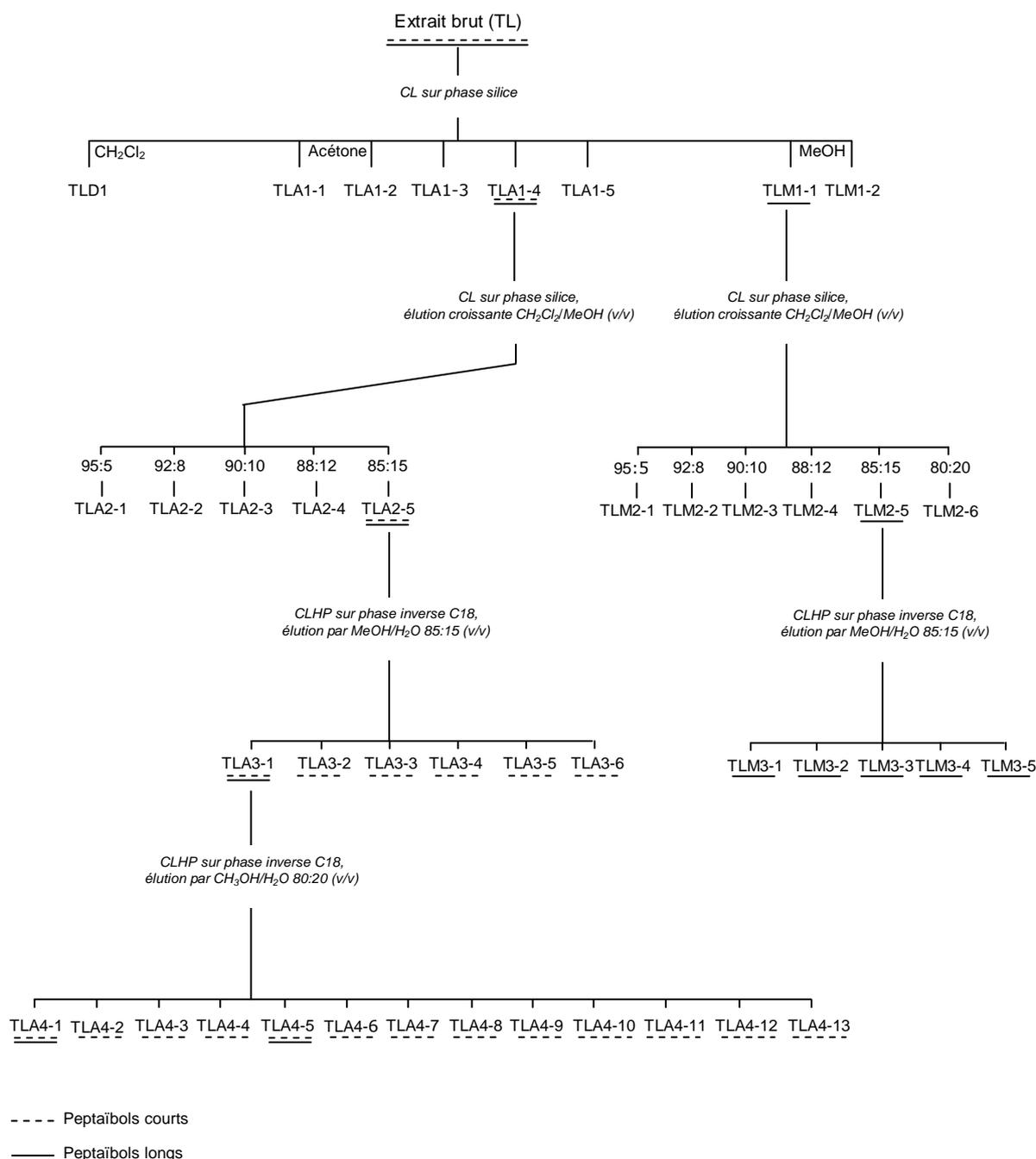
Les ions majoritaires sont représentés en gris foncé

Deux fractions présentent des mélanges de peptaïbols. La fraction TLM3-1 contient un mélange de deux peptaïbols, correspondant respectivement aux ions adduits sodium bichargés  $m/z$  984 (100%) et 991 (50%). Les ions monochargés sont également visibles ( $m/z$  1946 et 1960). La fraction TLM3-5 présente un mélange de trois peptaïbols :  $m/z$  991 (65%), 998 (100%) et 1005 (45%).

Les trois autres fractions (TLM3-2, TLM3-3 et TLM3-4) sont plus pures et correspondent respectivement aux ions  $m/z$  991 et 998.

### III-2-1-3- Synthèse des étapes séparatives des peptaïbols produits par *T. longibrachiatum*

Les deux grandes familles de peptaïbols produits par *T. longibrachiatum* ont été isolées des fractions acétone et méthanol. La Figure 3-24 (page suivante) reprend les grandes étapes séparatives permettant d'obtenir les peptaïbols à partir des extraits bruts.



**Figure 3-24 : Synthèse des étapes d'obtention des peptaïbols produits par *T. longibrachiatum***

Les peptaïbols courts ont été séparés exclusivement à partir des fractions acétone contrairement aux peptaïbols longs, présents aussi bien dans les fractions acétone (TLA4-1 et TLA4-4) et méthanol. Toutefois, nous pouvons considérer que les peptaïbols longs sont majoritairement élués dans les fractions méthanol. En effet, les fractions TLA4-1 et TLA4-4 présentent des masses très faibles par rapport aux fractions purifiées acétone (TLA3-2 à TLA3-6) et méthanol (TLM3-1 à TLM3-5).

### III-3- Validation du protocole d'obtention des peptaïbols

Comme nous l'avons énoncé au début de ce chapitre, nous avons voulu rechercher les peptaïbols dans les mêmes extraits que ceux utilisés pour l'étude des lipides. Ces extraits ne correspondaient pas à ceux utilisés préalablement au Laboratoire pour l'étude des peptaïbols de *Trichoderma* sp. (Landreau, 2001; Mohamed-Benkada, 2006).

Afin de savoir si les résultats obtenus étaient comparables à ceux obtenus avec les protocoles précédents, et donc valider les méthodes employées, nous avons réalisé une étude comparative sur une des deux souches, *T. longibrachiatum* MMS 151.

Pour cela, deux types de culture (M1 et M2) et deux méthodes d'extraction/purification (E1 et E2) ont été utilisés. Ils sont rappelés dans le Tableau 3-21.

**Tableau 3-21 : Culture et méthodes d'extraction/purification des peptaïbols**

<i>Trichoderma longibrachiatum</i> MMS 151		
Cultures	M1	M2
Milieu	Kohlmeyer modifié (KM)*	DCA*
Durée d'incubation	21 jours	10 jours
Température d'incubation	27° C	27° C
Méthodes d'Extraction/Purification	E1	E2
Extraction	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100%	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH, 50:50 (v/v)
Purification	Chromatographie liquide sous vide (silice greffée Diol). Gradient CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /EtOH, 98:2, 90:10 et 85:15 (v/v)  <u>Fraction enrichie : 90:10 (v/v)</u>	1/ Chromatographie liquide sur colonne ouverte (gel de silice). Elutions successives CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , acétone puis MeOH  2/ Chromatographie liquide (colonne ouverte, gel de silice) sur fractions <b>Acétone</b> . Gradient CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH, 100:0 à 80:20 (v/v)  <u>Fraction enrichie : 85:15 (v/v)</u>  3/ Chromatographie liquide (colonne ouverte, gel de silice) sur fractions <b>Méthanol</b> . Gradient CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH, 100:0 à 80:20 (v/v)  <u>Fraction enrichie : 85:15 (v/v)</u>
----- CLHP en phase inverse C18, MeOH/H <sub>2</sub> O 85:15 (v/v) -----		

\*milieu KM et DCA : cf. Partie 1, page 34

Afin de comparer ces milieux et ces extractions, trois protocoles ont été exécutés :

- Protocole **P1** : Culture **M1** – Extraction/Purification **E1** (Landreau, 2001; Mohamed-Benkada, 2006)
- Protocole **P2** : Culture **M2** – Extraction/Purification **E1** (protocole intermédiaire)
- Protocole **P3** : Culture **M2** – Extraction/Purification **E2** (protocole suivi dans les résultats précédents)

Les analyses des extraits obtenus ont été réalisées par spectrométrie de masse. Elles ont consisté à rechercher les grands groupes de peptaïbols : ceux à longues séquences (18-20 résidus) et ceux à

courtes séquences (11 résidus). Le Tableau 3-22 donne les résultats obtenus pour les différents protocoles ainsi que la présence des peptaïbols longs et courts.

**Tableau 3-22 : Etude comparative des milieux de culture, et des protocoles d'extraction et de purification des peptaïbols**

Protocole	P1	P2	P3	
Culture	M1	M2	M2	
Extraction/Purification	E1	E1	E2	
<b>Rendement d'extraction</b> (masse d'extrait/ L de culture gélosée)	161 mg/L	655 mg/L	1260 mg/L	
<b>Rendement de purification</b> (fraction enrichie/extrait brut, pds/pds)	7,1%	7,6%	15%	12%
<b>Peptaïbols observés</b>	PC + PL	PC + PL	PC	PL
<b>Poids total de la fraction enrichie en peptaïbols</b> (pds/v)	13 mg/L	50 mg/L	189 mg/L	151 mg/L

PC : peptaïbols courts, PL : peptaïbols longs

Deux constats peuvent être effectués, d'une part, sur le rendement d'extraction et d'autre part, sur le rendement de purification des peptaïbols :

- La masse d'extrait obtenue après extraction de la biomasse est plus importante lorsque le champignon est cultivé sur milieu DCA (cultures **M2**) et augmente avec la méthode **E2**
- La quantité de la fraction enrichie en peptaïbols augmente lorsque la biomasse est extraite puis purifiée par la méthode **E2**

### III-3-1- *Trichoderma harzianum*

Un extrait lipidique de 1100 mg a été obtenu après l'étape d'extraction de la biomasse fongique. Les fractions acétone et méthanol provenant de la première chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice ont permis, comme c'est le cas pour l'autre souche de *Trichoderma*, d'accéder aux différents peptaïbols.

#### III-3-1-1- Fraction acétone

Sept fractions ont été collectées lors de l'élution à l'acétone, nommées THA1-1 à THA1-7. Après analyse CCM, les peptaïbols étaient concentrés dans les trois dernières. Ces fractions ont donc été regroupées pour donner la fraction THA1-5 (42 mg) qui a été purifiée par une deuxième chromatographie liquide sur une colonne ouverte de gel de silice. L'élution a été réalisée par un gradient discontinu d'un mélange binaire dichlorométhane/méthanol en procédant de la même manière que pour *T. longibrachiatum*.

La fraction contenant les peptaïbols, THA2-5, a été éluée par le mélange dichlorométhane/méthanol 85:15 (v/v) et correspond à une masse de 18 mg, soit 43% de la fraction déposée en tête de colonne et 1,6% de l'extrait lipidique.

Cette fraction a été directement purifiée en CLHP dans les mêmes conditions que pour *T. longibrachiatum*. Des injections analytiques ont été réalisées à raison de 0,5 mg de produit à un débit de 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Le chromatogramme UV obtenu pour la fraction THA2-5 est présenté Figure 3-25.

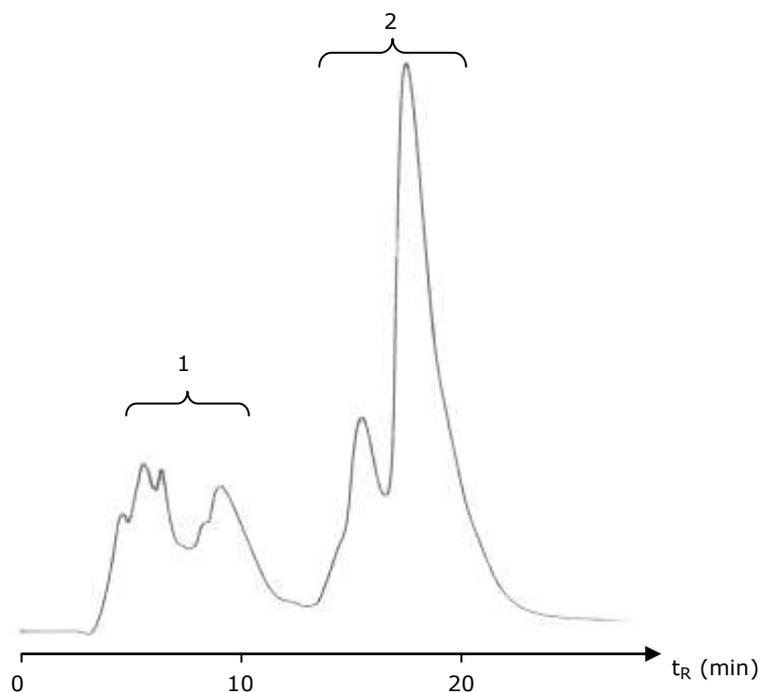


Figure 3-25 : CLHP de la fraction THA2-5

Deux fractions globales ont été récoltées, respectivement, de 3 à 13 minutes et de 13 à 22 minutes. Cette dernière correspond à la fraction majoritaire (85% de l'extrait injecté) et ont été analysées en spectrométrie de masse (Figure 3-26).

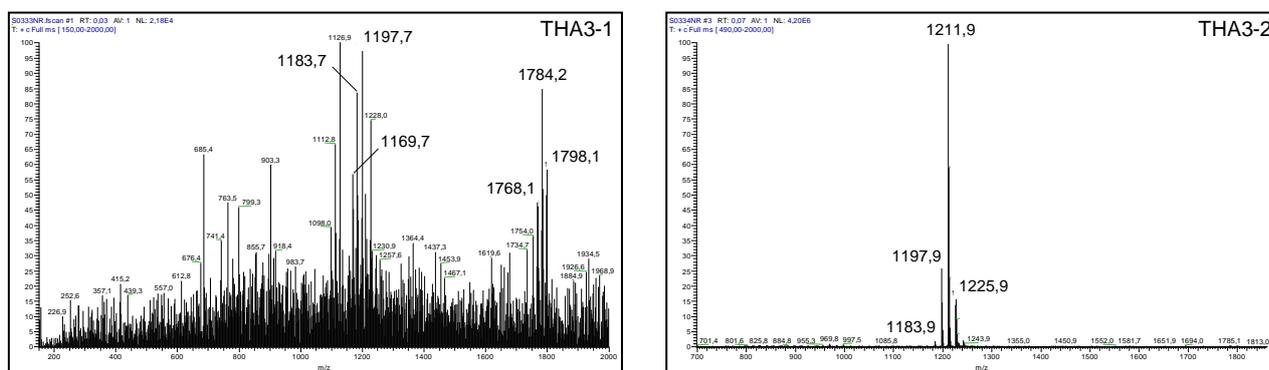


Figure 3-26 : Spectres d'ions totaux des fractions CLHP THA3-1 et THA3-2

La première fraction CLHP correspond à un mélange assez complexe de plusieurs produits. L'observation d'un bruit de fond non négligeable révèle un faible niveau de pureté et une faible concentration. Des observations similaires ont été notées pour la fraction équivalente chez *T. longibrachiatum* (TLA3-1) qui a nécessité une deuxième étape CLHP préparative.

Néanmoins, on retrouve des ions déjà observés chez *T. longibrachiatum* correspondant à des peptaïbols courts à 11 résidus ( $m/z$  1169, 1183 et 1197) et des peptaïbols longs à 18 résidus ( $m/z$  1768, 1784 et 1798).

### III-3-1-2- Fraction méthanol

Trois fractions, THM1-1 à THM1-3 ont été collectées lors de l'élution au méthanol. L'analyse CCM a révélé la présence de peptaïbols dans les deux premières fractions. Ces fractions ont donc été regroupées pour donner la fraction THM1-1 (414 mg). Une deuxième chromatographie liquide sur une colonne ouverte de gel de silice (élution par gradient discontinu dichlorométhane/méthanol) a été entreprise.

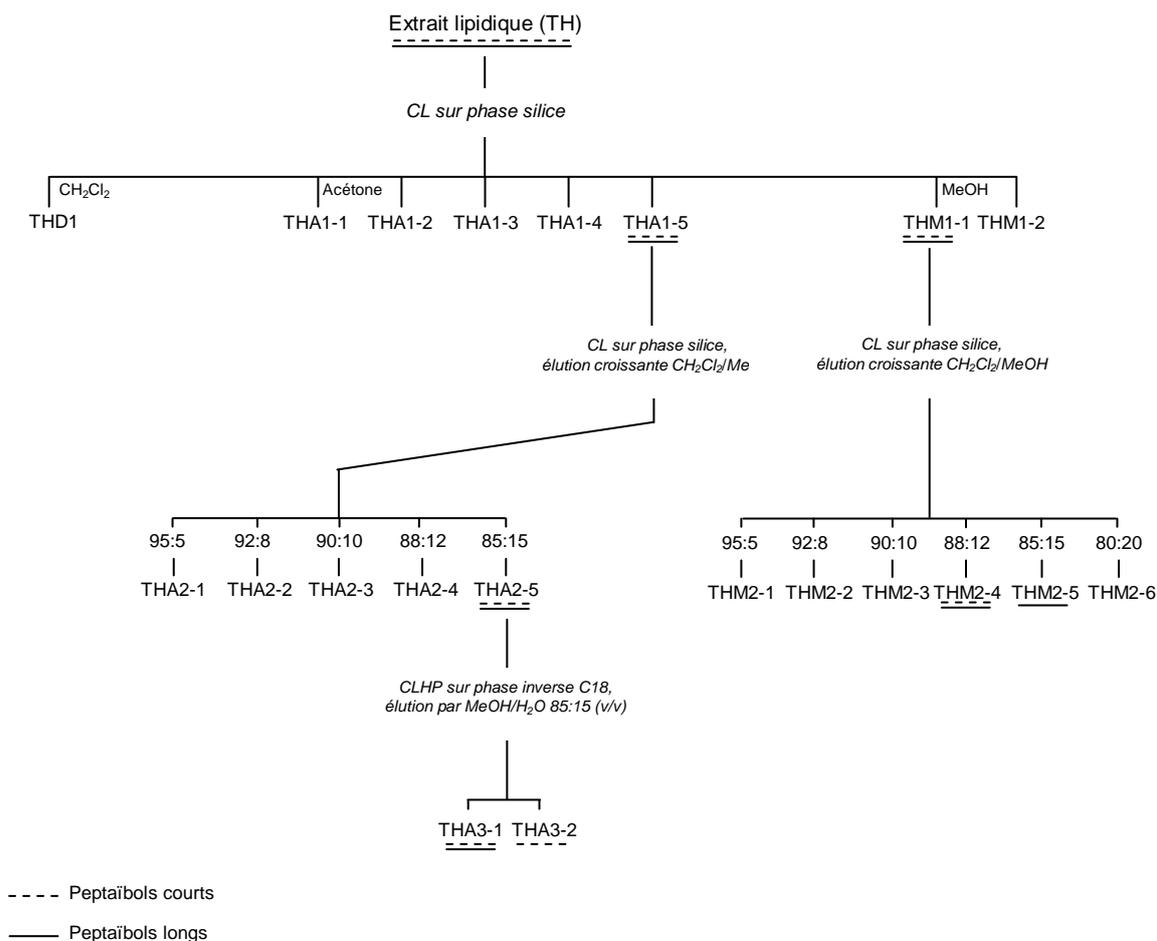
Deux fractions, THM2-4 et THM2-5, correspondant respectivement à l'élution par les mélanges dichlorométhane/méthanol 88:12 et 85:15 (v/v), se sont révélées enrichies en peptaïbols. Elles présentaient respectivement des masses de 68 et 178 mg soit 6% et 16% de l'extrait brut. Ces deux fractions ont été analysées séparément compte tenu de leur profil en CCM différent.



peptaïbols à 18 résidus. Il est intéressant de noter qu'ici, les ions observés dans la trappe d'ions sont principalement générés sous forme d'adduits sodium monochargés contrairement à ce qui a déjà été observé pour les peptaïbols longs.

### III-3-1-3- Synthèse des étapes de séparation des peptaïbols

Comme chez *T. longibrachiatum*, les deux grandes familles de peptaïbols produits par *T. longibrachiatum* ont été isolées à partir de l'extrait lipidique. La Figure 3-29 résume les étapes d'obtention des peptaïbols courts et longs.



**Figure 3-29 : Synthèse des étapes d'obtention des peptaïbols à partir des extraits lipidiques de *T. harzianum***

Contrairement à *T. longibrachiatum*, chez *T. harzianum*, les peptaïbols courts ont été séparés à la fois à partir des fractions acétone et méthanol. Ils sont d'ailleurs plus abondamment présents dans la fraction méthanol (THM2-4, 68 mg) que dans la fraction acétone correspondante (THA2-5, 18 mg).

## III-4- Analyse des peptaïbols courts

### III-4-1- Peptaïbols courts de *Trichoderma longibrachiatum*

Nous allons dans un premier temps présenter l'analyse des séquences des peptaïbols à 11 résidus majoritaires isolés dans les fractions TLA3-2 à TLA3-6 (cf. Figure 3-24, page 197). Suivra ensuite l'analyse des fractions TLA4-1 à TLA4-13 issues de la CLHP préparative sur la fraction TLA3-1. Chacune des fractions TLA3-2 à TLA3-6 a également été hydrolysée puis les acides aminés analysés en CPG/SM afin de rechercher quels isomères Vxx et Lxx sont rentrent dans la composition des peptaïbols étudiés. Les résultats de ces analyses sont présentés, pour chaque fraction, après l'analyse par fragmentation.

#### III-4-1-1- Peptaïbols à 11 résidus : fractions TLA3-2 à TLA3-6

##### III-4-1-1-1- Ion $m/z$ 1155

Dix séquences microhétérogènes ont pu être déterminées par les analyses SM<sup>n</sup> et CID/SM<sup>n</sup> des fragmentations  $b_n/a_n$  et SM<sup>2</sup> de la fragmentation  $y_n$  correspondant aux différents échanges entre les résidus Vxx et Lxx aux positions 3, 4, 7, 8 et 11 (Figure 3-30).

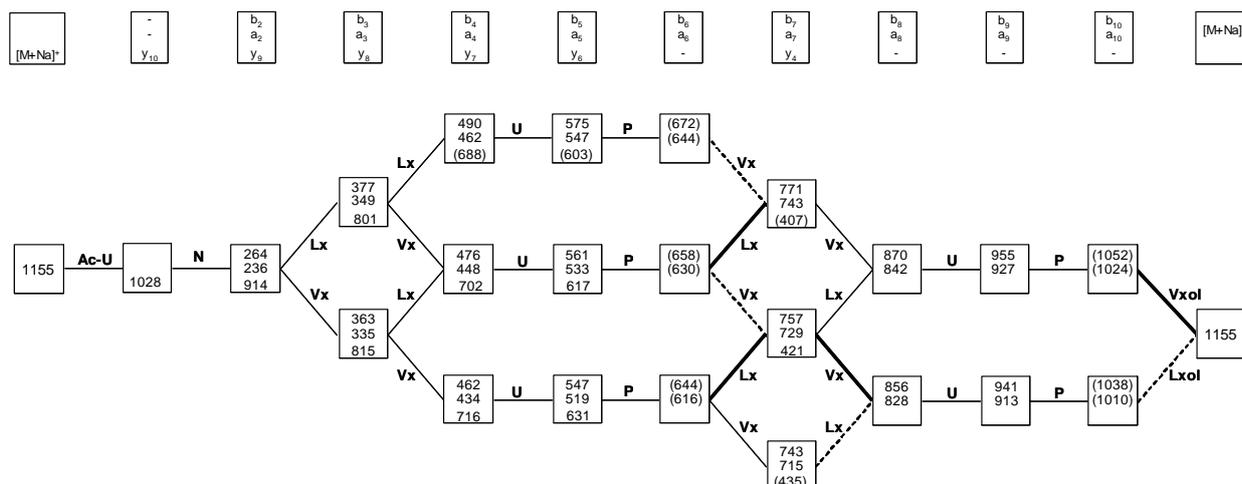


Figure 3-30 : Graphe de filiation  $b_n a_n y_n$  de l'ion  $m/z$  1155

L'analyse en spectrométrie de masse fait apparaître des voies de filiations prioritaires qui interviennent principalement au niveau de l'amino-alcool et des résidus en position 8 et 7 :

- les séquences microhétérogènes majoritaires présentent un résidu Vxx réduit en position C-terminale
- en position 8 sont principalement incorporés des résidus Vxx pour les séquences possédant un Lxxol alors que pour contenant un Vxxol présentent à la fois des Vxx et des Lxx
- des résidus Lxx ont principalement été observés en position 7 chez les deux types de séquences (Vxxol et Lxxol)

L'analyse CPG/SM a révélé la présence de Val, Leu, Ile, Valol et Leuol. Il est alors possible d'attribuer pour les séquences déterminées les résidus Val, Valol, Leuol à la place des Vxx, Vxxol et Lxxol. Par contre, les Leu et Ile ayant été détectées toutes les deux, il nous est impossible de différencier leur

position respective au sein des séquences peptidiques. Sur les dix séquences déterminées, trois d'entre elles sont majoritaires et figurent en gras :

**Ac U N V Lx U P V Lx U P Vol**  
**Ac U N V Lx U P Lx V U P Vol**  
**Ac U N V V U P Lx Lx U P Vol**  
 Ac U N Lx Lx U P V V U P Vol  
 Ac U N Lx V U P V Lx U P Vol  
 Ac U N Lx V U P Lx V U P Vol  
 Ac U N Lx V U P V V U P Lol  
 Ac U N V Lx U P V V U P Lol  
 Ac U N V V U P Lx V U P Lol  
 Ac U N V V U P V Lx U P Lol

### III-4-1-1-2- Ion $m/z$ 1169

Comme c'est le cas pour l'ion précédent, plusieurs séquences microhétérogènes ont été observées pour l'ion  $m/z$  1169. Le graphe de filiation de l'ion est présenté Figure 3-31.

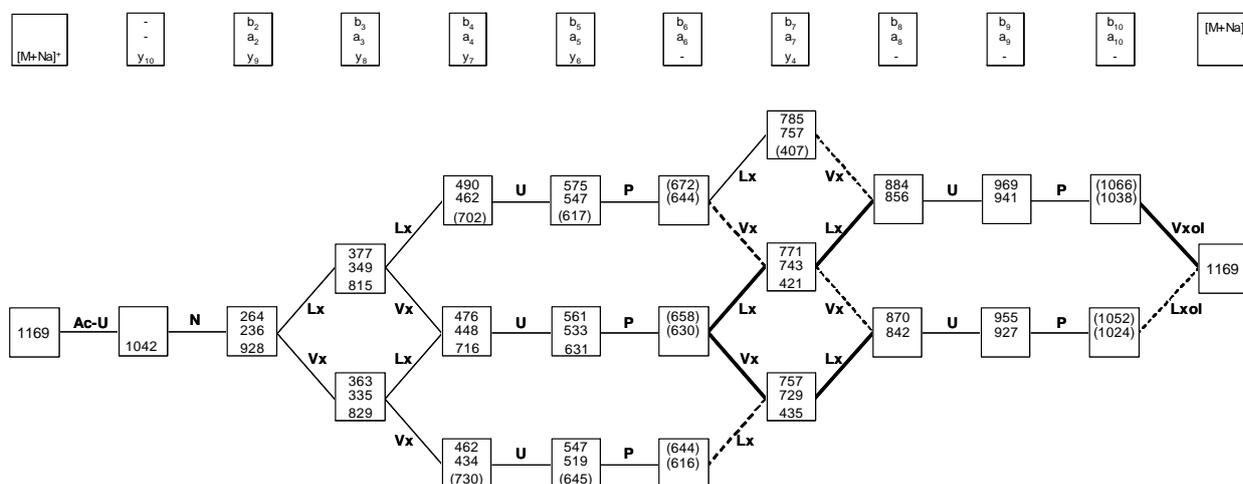


Figure 3-31 : Graphe de filiation  $b_n$ ,  $a_n$ ,  $y_n$  de l'ion  $m/z$  1169

L'analyse CPG/SM des acides aminés après hydrolyse de la fraction TLA3-3 a révélé, comme pour la fraction précédente, la présence de Val, Leu, Ile, Valol et Leuol. Là encore une imprécision demeure quant à l'attribution des résidus Leu et Ile dans la séquence peptidique.

Comme pour l'ion  $m/z$  1155, l'analyse de la fragmentation a montré une prédominance des séquences possédant un Valol sur celles contenant un Leuol. Ceci a été déterminé par comparaison de l'intensité relative des ions fragments  $b_9/a_9$  à  $m/z$  941/969 ( $M - [\text{Pro-Valol}]$ ) et à  $m/z$  927/955 ( $M - [\text{Pro-Leuol}]$ ).

Quatre séquences microhétérogènes présentant un Valol en position C-terminale et 6 par un Leuol peuvent être observées d'après le graphe de filiation. Contrairement à l'ion  $m/z$  1155, toutes les combinaisons de séquences n'ont pas été observées malgré l'observation par fragmentation (en SM<sup>n</sup> et/ou en CID-SM) de tous les ions fragments constituant le graphe de filiation.

Sur les dix séquences possibles, seules sept ont été identifiées dont deux sont majoritaires (en gras) :

**Ac U N V Lx U P Lx Lx U P Vol**  
**Ac U N Lx V U P Lx Lx U P Vol**  
 Ac U N Lx Lx U P V Lx U P Vol  
 Ac U N Lx Lx U P Lx V U P Vol  
 Ac U N V V U P Lx Lx U P Lol  
 Ac U N V Lx U P V Lx U P Lol  
 Ac U N Lx V U P V Lx U P Lol

### III-4-1-1-3- Ion $m/z$ 1183

Cinq séquences microhétérogènes ont été identifiées pour l'ion  $m/z$  1183 et sont présentées dans le graphe de filiation ci-dessous (Figure 3-32).

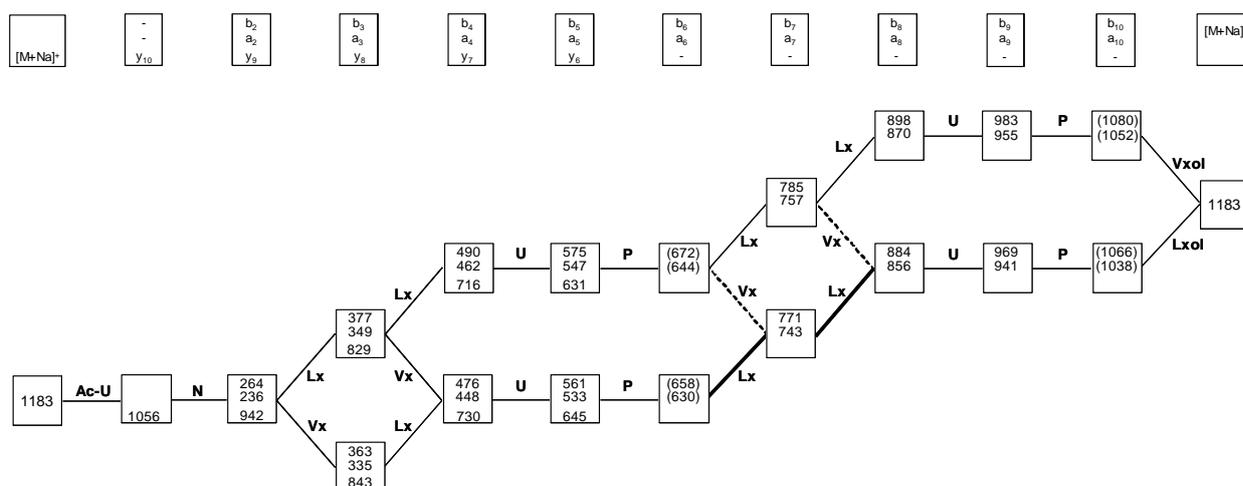


Figure 3-32 : Graphe de filiation  $b_n a_n y_n$  de l'ion  $m/z$  1183

L'analyse de la composition en acides aminés par CPG/SM a permis de mettre en évidence pour cet ion la présence de Val, Leu, Ile, Valol et Leuol.

Cinq séquences microhétérogènes possibles ont été observées. Une séquence présente un Valol et les quatre autres un Leuol en position C-terminale. Parmi elles, trois sont majoritaires :

**Ac U N Lx Lx U P Lx Lx U P Vol**  
**Ac U N Lx V U P Lx Lx U P Lol**  
**Ac U N V Lx U P Lx Lx U P Lol**  
 Ac U N Lx Lx U P Lx V U P Lol  
 Ac U N Lx Lx U P V Lx U P Lol

Les intensités relatives des ions fragments  $b_9/a_9$  ( $m/z$  955/983) concernant la séquence « Valol » sont assez importantes (85/35%) mais légèrement plus faibles que celles des séquences « Leuol ». Il a été possible de distinguer deux séquences « Leuol » principales. Il s'agit des deux séquences présentant les inversions Val/Lxx en position 3-4. On peut alors considérer que les intensités relatives des ions fragments  $m/z$  941/969 (100/35%) correspondent à ces deux séquences exclusivement, les deux autres (Val<sub>7</sub> et Val<sub>8</sub> respectivement) sont minoritaires.

### III-4-1-1-4- Ion $m/z$ 1197

La fragmentation de l'ion  $m/z$  1197 a permis de mettre en évidence une seule séquence dont les positions 3, 4, 7, 8 et 11 sont occupées par des résidus Lxx (Figure 3-33).

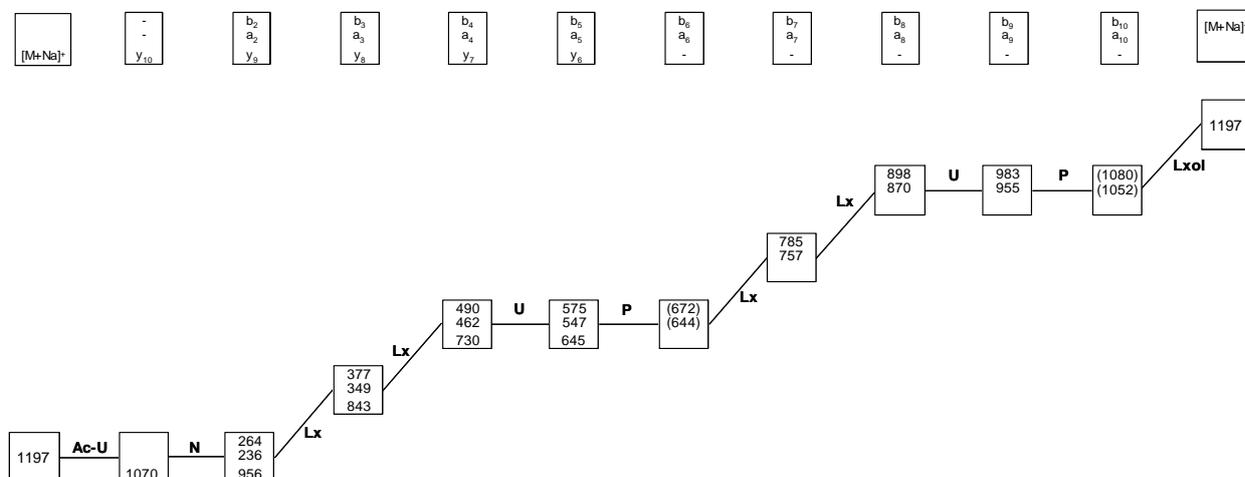


Figure 3-33 : Graphe de filiation  $b_n a_n y_n$  de l'ion  $m/z$  1197

Après analyse de la composition en AA, la Leu, l'Ile et le Leuol ont été détectés dans l'hydrolysate (le courant ionique total du chromatogramme CPG/SM est présenté Annexe 4) nous permettant de proposer une séquence : **Ac U N Lx Lx U P Lx Lx U P Lol**

Toutefois, il nous est impossible de savoir si cet ion correspond à un mélange de séquences microhétérogènes dues à plusieurs échanges entre les Leu et Ile aux positions 3, 4, 7 et 8 ou à une seule séquence pour laquelle les Leu et Ile occuperaient des positions spécifiques, par exemple, les Leu aux positions 3 et 4, et les Ile aux positions 7 et 8.

### III-4-1-1-5- Ion $m/z$ 1211

Comme c'est le cas pour l'ion  $m/z$  1197, l'ion  $m/z$  1211 correspond à un seul type de séquence et diffère des peptaïbols précédents par la présence d'une Gln à la place de l'Asn en position 2 (Figure 3-34).

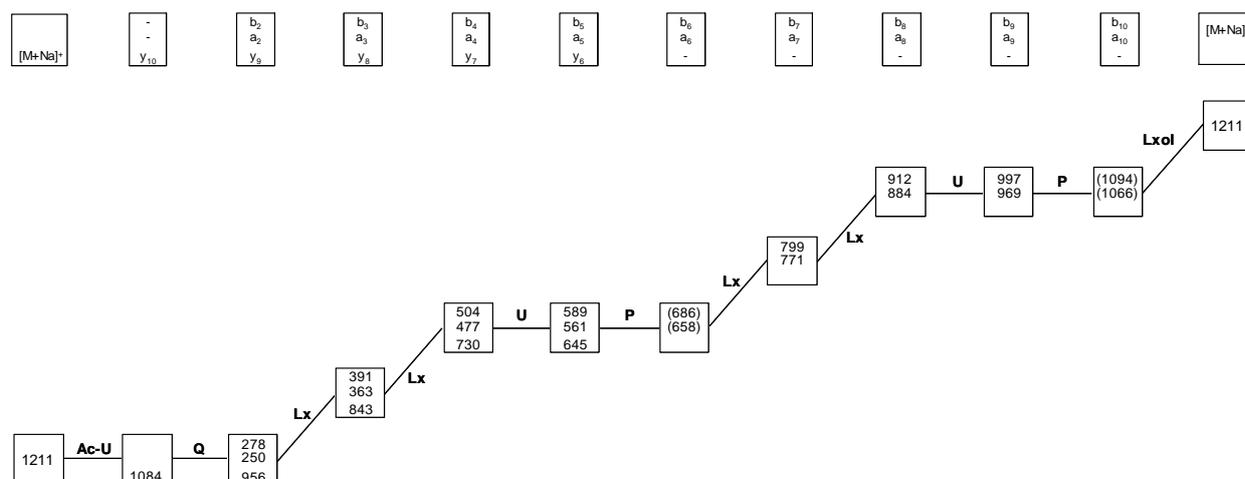


Figure 3-34 : Graphe de filiation  $b_n a_n y_n$  de l'ion  $m/z$  1211

Contrairement à l'ion  $m/z$  1197, l'analyse des acides aminés concernant ce peptaïbol a révélé la présence, en plus des Leu, Ile et Leuol, de l'Ieol. Ainsi, l'analyse CGP/SM a permis d'identifier un type de séquence supplémentaire présentant un Ileol en position C-terminale. Deux types de séquences microhétérogènes sont donc présents :



### III-4-1-2- Etude des sous-fractions TLA4-2 à TLA4-13

Nous avons décrit précédemment que la fraction TLA3-1 a nécessité une deuxième étape CLHP préparative (cf. page 191). Treize fractions ont été collectées et les différents ions observés en spectrométrie de masse ont été analysés successivement en SM<sup>n</sup>. L'ensemble des ions observés est regroupé dans le Tableau 3-23.

Tableau 3-23 : Principaux ions observés dans les fractions TLA4-1 à TLA4-13

Ions	Fractions TLA4-												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
903	■												
910	■												
955	■	■											
969	■	■											
983		■	■										
997		■											
1040				■	■	■	■	■	■				
1054	■			■	■	■	■	■	■				
1056					■	■	■	■	■				
1068	■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1070							■	■	■				
1072				■			■	■	■				
1082							■	■	■			■	■
1084	■						■	■	■	■	■	■	■
1086				■			■	■	■	■	■	■	■
1096										■	■		
1098												■	■
1100				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1114							■	■	■	■	■	■	■
1128									■	■			
1141											■	■	■
1155											■	■	■

Les ions majoritaires sont représentés en foncé

Les ions  $m/z$  903 et 910 correspondent à des ions bichargés de peptaïbols longs. Les masses moléculaires déduites à partir adduits sodium bichargés sont respectivement de 1760 et 1774 Da, caractéristiques de peptaïbols à 18 résidus. L'analyse de ces peptaïbols sera présentée ultérieurement.

Sont également présents des peptaïbols à 11 résidus dont notamment les ions  $m/z$  1141 et 1155 débutant la série des peptaïbols analysés précédemment. L'ion  $m/z$  1141 a été analysé et présente dans sa séquence variable 4 résidus Vxx et un résidu Lxx. Le graphe de filiation est présenté Figure 3-35, page suivante.

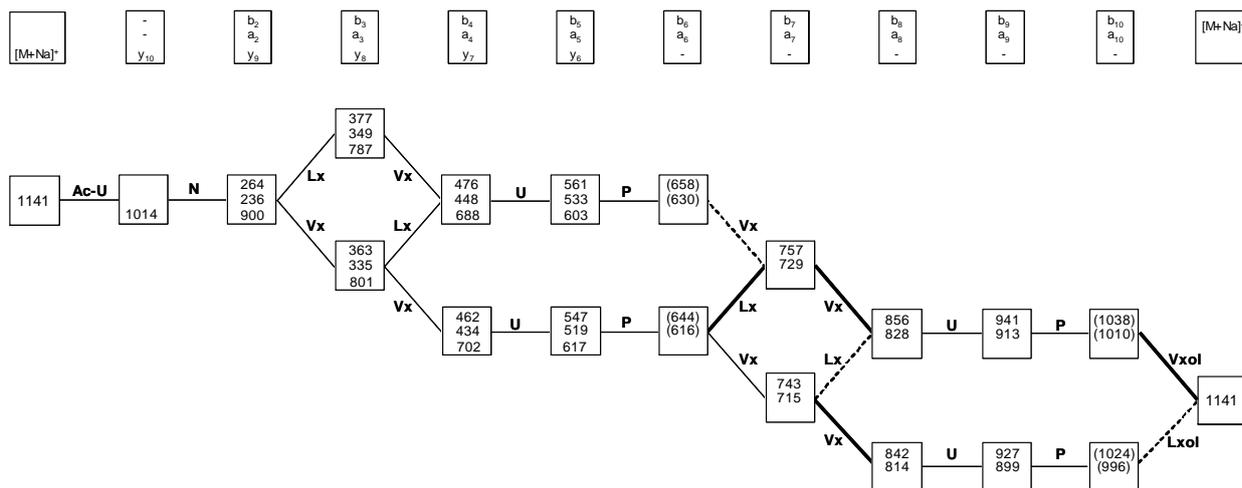
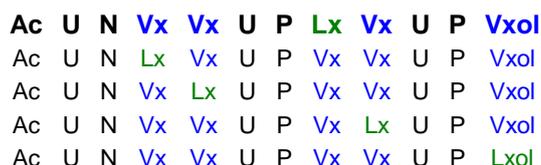


Figure 3-35 : Graphe de filiation de l'ion m/z 1141

Cinq séquences microhétérogènes (quatre séquences présentant un Vxxol et une un Lxxol) ont été identifiées par analyses en  $SM^n$  des ions  $b_n/a_n$  et en  $Sm^2$  des ions  $y_n$ . Une des quatre séquences, présentant un résidu Lxx en position 7, domine les quatre autres :



Tous les autres ions présents dans les différentes fractions correspondent à des peptides de 9 et 10 résidus de la même famille que celle des peptaïbols à 11 résidus produits par cette souche. En effet, pour tous les ions observés dans ces fractions, une partie de la séquence peptidique semble commune. Cette partie commune, observable en totalité ou partie, correspond au segment peptidique microhétérogène contenant les résidus de la position 1 à 7 (Figure 3-36).

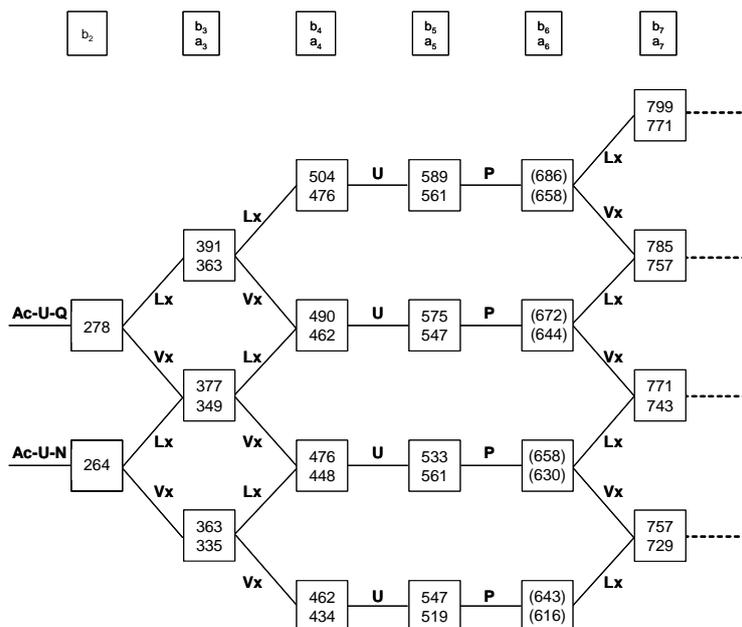


Figure 3-36 : Partie microhétérogène commune à tous les peptides

Au-delà de la position 7, les résidus 8, 9, 10 (et 11) correspondent à différentes terminaisons possibles en fonction du nombre de résidus constituant les peptides (Figure 3-37).

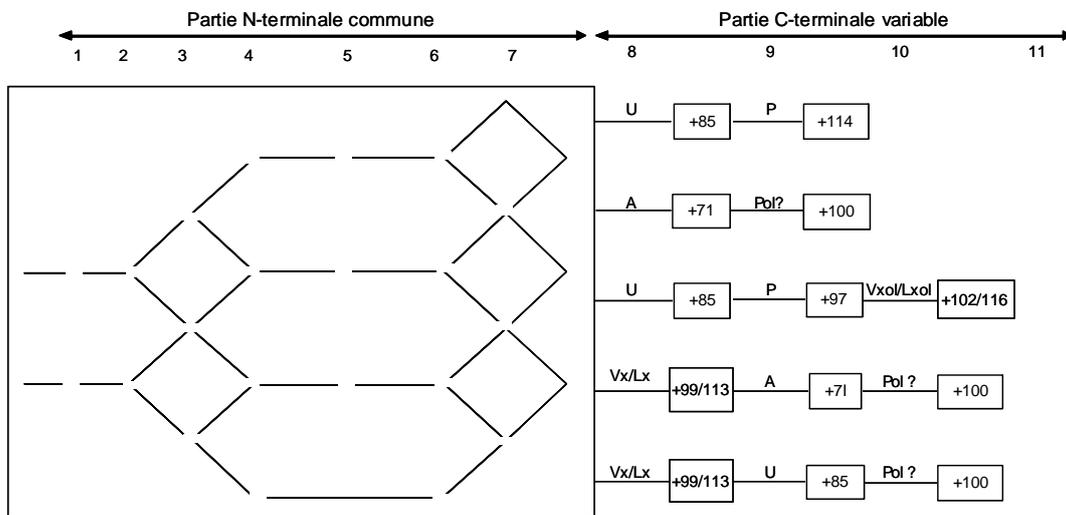


Figure 3-37 : Différentes terminaisons C-terminales possibles à 2, 3 ou 4 résidus

### III-4-2- Peptaïbols courts de *Trichoderma harzianum*

Comme nous l'avons montré dans le chapitre Obtention des peptaïbols, les peptaïbols courts ont été isolés chez *T. harzianum* MMS 752 à partir des fractions acétone THA3-2 et méthanol THM2-4 (cf. Figure 3-29, page 203).

#### III-4-2-1- Sous-fractions THA3-2 et THM2-4

##### III-4-2-1-1- Ions $m/z$ 1197

La fragmentation de l'ion  $m/z$  1197 a permis de mettre en évidence cinq séquences microhétérogènes (Figure 3-38).

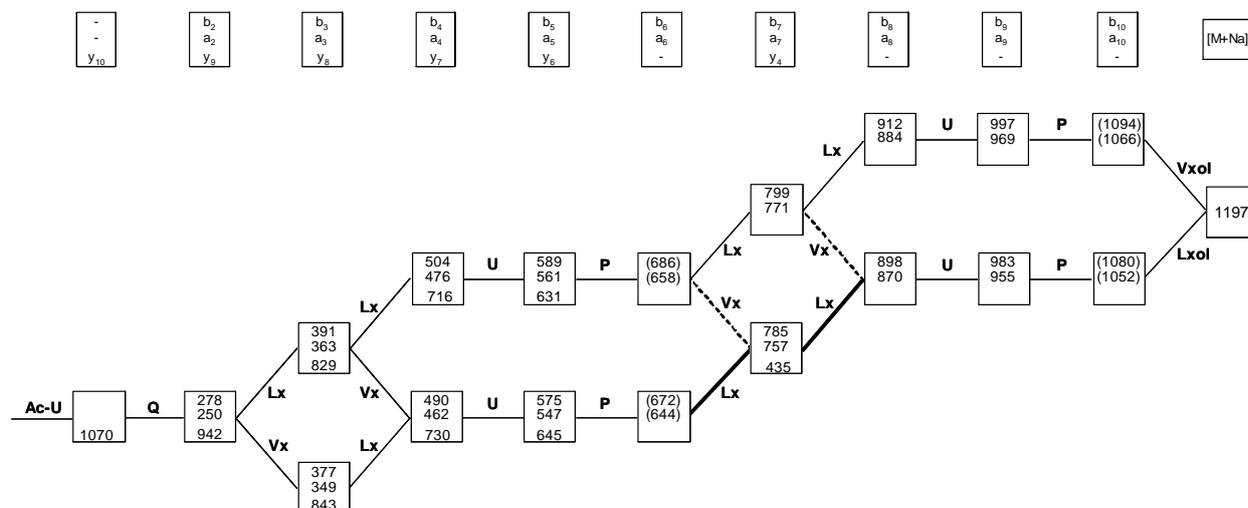


Figure 3-38 : Graphe de filiation  $b_n a_n y_n$  de l'ion  $m/z$  1197

La microhétérogénéité est principalement due aux échanges entre résidus Vxx et Lxx en position 3, 4 et 11. Ainsi sur les cinq séquences possibles, trois sont majoritaires :

Ac U Q Lx Lx U P Lx Lx U P Vxol  
 Ac U Q Vx Lx U P Lx Lx U P Lxol  
 Ac U Q Lx Vx U P Lx Lx U P Lxol  
 Ac U Q Lx Lx U P Vx Lx U P Lxol  
 Ac U Q Lx Lx U P Lx Vx U P Lxol

Les deux autres, présentant respectivement un Vxx en position 7 ou 8, ont été très peu observées au cours de l'analyse SM<sup>n</sup>.

### III-4-2-1-2- Ion $m/z$ 1211

Contrairement à l'ion  $m/z$  1197, microhétérogène, un seul type de séquence a été déterminé par l'analyse SM<sup>n</sup> (Figure 3-39) pour l'ion  $m/z$  1211.

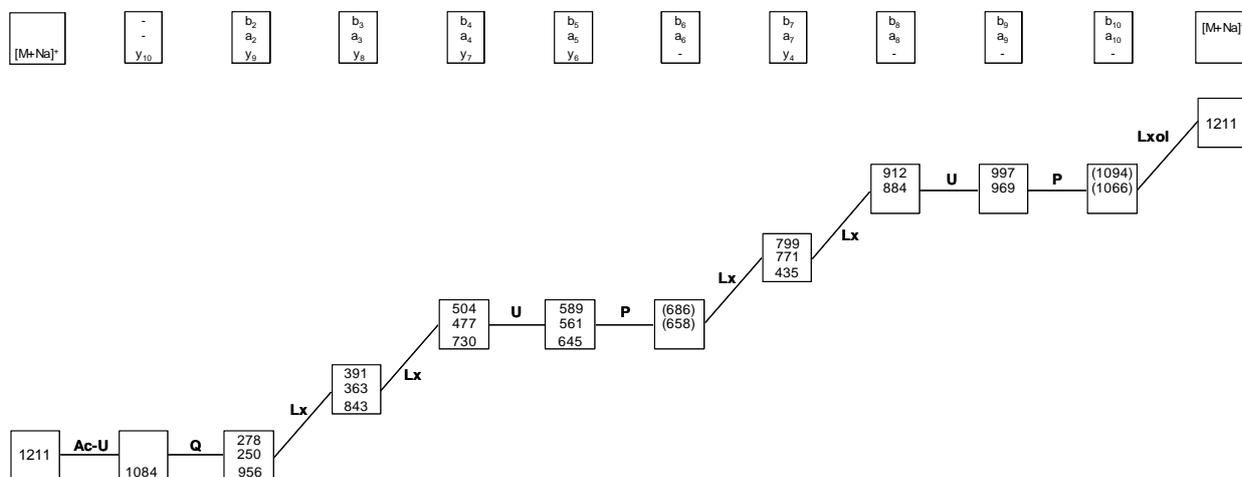


Figure 3-39 : Graphe de filiation  $b_n a_n y_n$  de l'ion  $m/z$  1211

Il s'agit d'un peptaïbol présentant uniquement des résidus Lxx aux positions variables 3, 4, 7, 8 et 11, similaire à celui observé chez *T. longibrachiatum* pour lequel au moins deux séquences ont pu être identifiées (Leuol et Ileol). Ici, nous proposons une seule séquence, compte tenu que l'analyse des acides aminés par CPG/SM n'a pas été réalisée : **Ac U Q Lx Lx U P Lx Lx U P Lxol**

### III-4-2-1-3- Ion $m/z$ 1225

L'ion  $m/z$  1225 diffère des deux peptaïbols précédents par son extrémité N-terminale (Figure 3-40).

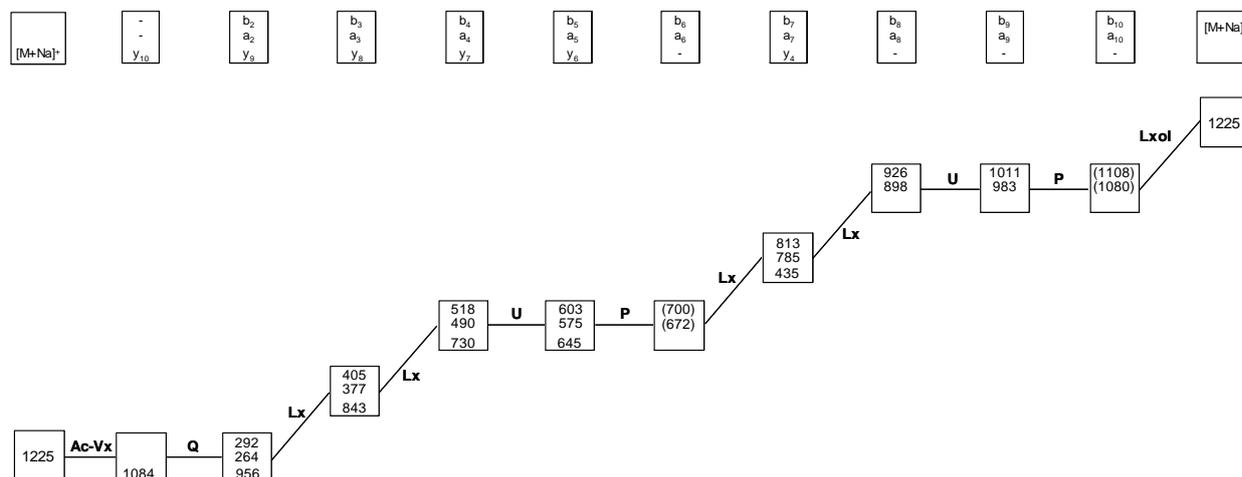


Figure 3-40 : Graphe de filiation  $b_n a_n y_n$  de l'ion  $m/z$  1225

En effet, chez ce dernier, un résidu Vxx est acétylé en position 1 contrairement à un Aib généralement et en particulier chez les peptaïbols à 11 résidus que nous venons d'étudier. Le fragment caractéristique [Ac-Vx<sub>1</sub>-Q<sub>2</sub>] à  $m/z$  292 ( $b_2$ ) et son homologue à  $m/z$  264 ( $a_2$ ) ont été observés en CID-SM<sup>2</sup> à partir des fragmentations des ions  $m/z$  518 ( $b_4$ ) et 405 ( $b_3$ ). De plus, l'extrémité N-terminale Ac-Vx-Q est confirmée par l'observation des ions ammoniums  $y_{10}$  ( $m/z$  1084) et  $y_9$  ( $m/z$  956).

### III-4-3- Bilan des peptaïbols courts observés chez les souches de *Trichoderma* : trichobrachines et trichodharzines

Les différentes séquences de peptaïbols courts à 11 résidus identifiées chez les deux souches de *Trichoderma* sont compilées ci-dessous (Tableau 3-24). Pour la souche *T. longibrachiatum*, toutes les séquences ont été nommées trichobrachines. Celles présentant une Asn en position 2 ont été nommées trichobrachines A-II/IX en accord avec la définition proposée par Mohamed-Benkada *et al.* (2006). En effet, il s'agit de peptaïbols produits par la même souche dont le résidu en position 9 est un Aib. Les deux séquences possédant une Gln en position 2 ont été nommées trichobrachines C-II/II. Certaines des 30 séquences identifiées pourraient correspondre à des séquences déjà décrites sous réserve d'identité de position des Leu et Ile. Néanmoins, bien que la position de ces isomères n'ait pu être déterminée, 22 nouvelles séquences ont été identifiées. Chez *T. harzianum*, les sept séquences ont été nommées trichodharzines A (Aib en position 1) et B (Vxx en position 1). Deux d'entre elles correspondent à de nouvelles séquences pour l'ion  $m/z$  1197. Il s'agit de séquences minoritaires qui présentent respectivement un Vxx aux positions 7 et 8 (trichodharzines AI-d et e).

Tableau 3-24 : Séquences des peptaïbols à 11 résidus produits par *T. longibrachiatum* et *T. harzianum*

[M+Na] <sup>+</sup> m/z	MM (Da)	Position											Souches		Séquences			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	TL	TH	identifiées	similaires déjà décrites		
1141	1118	Ac U N Vx Vx U P Lx Vx U P Vxol	+	-											+	-	<b>Trichobrachine A-VI a</b>	-
		Ac U N Lx Vx U P Vx Vx U P Vxol	+	-											+	-	Trichobrachine A-VI b	-
		Ac U N Vx Lx U P Vx Vx U P Vxol	+	-											+	-	Trichobrachine A-VI c	-
		Ac U N Vx Vx U P Vx Lx U P Vxol	+	-											+	-	Trichobrachine A-VI d	-
		Ac U N Vx Vx U P Vx Vx U P Lxol	+	-											+	-	Trichobrachine A-VI e	-
1155	1132	Ac U N V Lx U P V Lx U P Vol	+	-											+	-	<b>Trichobrachine A-VII a</b>	-
		Ac U N V Lx U P Lx V U P Vol	+	-											+	-	<b>Trichobrachine A-VII b</b>	-
		Ac U N V V U P Lx Lx U P Vol	+	-											+	-	<b>Trichobrachine A-VII c</b>	-
		Ac U N Lx Lx U P V V U P Vol	+	-											+	-	Trichobrachine A-VII d	-
		Ac U N Lx V U P V Lx U P Vol	+	-											+	-	Trichobrachine A-VII e	-
		Ac U N Lx V U P Lx V U P Vol	+	-											+	-	Trichobrachine A-VII f	-
		Ac U N Lx V U P V V U P Lol	+	-											+	-	Trichobrachine A-VII g	-
		Ac U N V Lx U P V V U P Lol	+	-											+	-	Trichobrachine A-VII h	-
		Ac U N V V U P Lx V U P Lol	+	-											+	-	Trichobrachine A-VII j	-
		Ac U N V V U P V Lx U P Lol	+	-											+	-	Trichobrachine A-VII j	-
1169	1146	Ac U N V Lx U P Lx Lx U P Vol	++	-											++	-	<b>Trichobrachine A-III</b>	Trichorovine TV-Ia
		Ac U N Lx V U P Lx Lx U P Vol	++	-											++	-	<b>Trichobrachine A-IV</b>	Trichorovine TV-Ib
		Ac U N Lx Lx U P V Lx U P Vol	+	-											+	-	Trichobrachine A-II	-
		Ac U N Lx Lx U P Lx V U P Vol	+	-											+	-	Trichobrachine A-IV a	-
		Ac U N V V U P Lx Lx U P Lol	+	-											+	-	Trichobrachine A-IV b	-
		Ac U N V Lx U P V Lx U P Lol	+	-											+	-	Trichobrachine A-IV c	-
Ac U N Lx V U P V Lx U P Lol	+	-											+	-	Trichobrachine A-IV d	-		
1183	1160	Ac U N Lx Lx U P Lx Lx U P Vol	+++	-											+++	-	<b>Trichobrachine A-VIII a</b>	Trichorovines TV-Vb/VIb, Trichorozine I
		Ac U N Lx V U P Lx Lx U P Lol	+++	-											+++	-	<b>Trichobrachine A-VIII b</b>	Trichorovine TV-VIIa
		Ac U N V Lx U P Lx Lx U P Lol	+++	-											+++	-	<b>Trichobrachine A-VIII c</b>	Trichorovine TV-Va
		Ac U N Lx Lx U P Lx V U P Lol	+	-											+	-	Trichobrachine A-VIII d	-
		Ac U N Lx Lx U P V Lx U P Lol	+	-											+	-	Trichobrachine A-VIII e	Harzianine HB I
1197	1174	Ac U N Lx Lx U P Lx Lx U P Lol	+++	-											+++	-	<b>Trichobrachine A-IX</b>	Harzianine HK-VI, Trichorovine TV-XIIb, Trichorozin III
		Ac U Q Lx Lx U P Lx Lx U P Vxol	-	++											-	++	<b>Trichodharzine A-I a</b>	Trichorovine TV-IXb, Trichorozine II
		Ac U Q Vx Lx U P Lx Lx U P Lxol	-	++											-	++	<b>Trichodharzine A-I b</b>	Trichorovines TV-VIII/IXa, Hypomurocine A-III
		Ac U Q Lx Vx U P Lx Lx U P Lxol	-	++											-	++	<b>Trichodharzine A-I c</b>	Trichorovine TV-Xa, Hypomurocine A-IV
		Ac U Q Lx Lx U P Vx Lx U P Lxol	-	+											-	+	Trichodharzine A-I d	-
		Ac U Q Lx Lx U P Lx Vx U P Lxol	-	+											-	+	Trichodharzine A-I e	-
1211	1188	Ac U Q Lx Lx U P Lx Lx U P Lol	+	-											+	-	<b>Trichobrachine C-I</b>	Trichorovine TV-XIII, Trichorozine IV, Hypomurocine A-V/Va
		Ac U Q Lx Lx U P Lx Lx U P lol	+	-											+	-	<b>Trichobrachine C-II</b>	-
		Ac U Q Lx Lx U P Lx Lx U P Lxol	-	+++											-	+++	<b>Trichodharzine A-II</b>	Trichorovine TV-XIII/XIV
1225	1202	AcVx Q Lx Lx U P Lx Lx U P Lxol	-	+											-	+	<b>Trichodharzine B</b>	Trichofumine B

TL : *Trichoderma longibrachiatum*, TH : *Trichoderma harzianum*

Séquences microhétérogènes majoritaires pour chaque ion observé figurent en gras.

Abondance relative des peptaïbols, + : < 30%, ++ : comprise entre 30 et 60%, +++ : > 60%

Sur les 30 séquences microhétérogènes identifiées chez *T. longibrachiatum*, 12 séquences sont considérées comme majoritaires et 22 sont nouvelles. Quinze séquences proviennent des ions [M+Na]<sup>+</sup>  $m/z$  1141 (1118 Da) et 1155 (1132 Da) qui n'ont jamais été décrits auparavant. En effet, jusqu'à présent, les

plus petites masses moléculaires connues pour cette famille de peptaïbols étaient de 1146 Da ( $m/z$  1169). Six autres nouvelles séquences appartiennent aux ions  $m/z$  1169 et 1183 pour lesquelles des séquences de même masse moléculaire ont déjà été décrites. Enfin, une séquence nouvelle a également pu être identifiée, grâce à l'analyse CPG/SM de la fraction TLA3-6. Il s'agit de la trichobrachine C-II qui a la particularité de présenter un résidu Ileol en position 11. Cet amino-alcool a été décrit une seule fois chez les peptaïbols à 11 résidus et ce pour la trichorovine TV-XIIb, isolé de *T. viride* (Wada *et al.*, 1995).

Il est important de constater qu'il s'agit, pour les deux souches, de la première description de séquences de peptaïbols présentant des résidus Vxx en position 8.

Les autres peptaïbols courts à 9 et 10 résidus, exclusivement identifiés chez *T. longibrachiatum* et chez lesquels des incertitudes demeurent au niveau de leur extrémité C-terminale, n'ont pour le moment pas été nommés.



manière, et en comparaison des deux séquences observées, l'extrémité C-terminale Q-Lxol est supposée pour le deuxième peptide ( $m/z$  910).

### III-5-1-2- Peptaïbols à 20 résidus : fractions TLM3-1 à TLM3-5

Les fractions méthanol TLM3-1 à 5 sont caractérisées par la présence de peptaïbols à 20 résidus, observés en mode Fullscan principalement sous forme d'adduits sodium bichargés aux valeurs  $m/z$  984, 991, 998 et 1005 (cf. Figure 3-23, page 195). Le séquençage de ces ions a été réalisé de la même façon que pour les peptaïbols longs à 18 résidus décrits précédemment. Toutefois, il a également été possible de réaliser le séquençage à partir des ions monochargés. Les séquences ont donc été déterminées à la fois grâce à la fragmentation des ions mono et bichargés (Figure 3-43, page suivante).

L'extrémité N-terminale Ac-U-A, commune à tous les peptides séquencés, est supposée d'une part, d'après les différentes valeurs des fragments  $y_{18}$  identifiés et d'autre part, d'après les séquences déjà publiées correspondant à cette famille de peptaïbols (cf. Tableau 3-9 page 153).

Pour chaque ion, la fragmentation  $SM^2$  fait clairement apparaître les deux fragments issus du clivage préférentiel Aib-Pro avec l'observation des ions  $b_{13}$ ,  $a_{13}$  et  $y_7$ . Certaines parties de séquences sont supposées telles que l'extrémité N-terminale Ac-U<sub>1</sub>-A<sub>2</sub> ou le segment [P<sub>14</sub>-Vx<sub>15</sub>].

Deux séquences microhétérogènes sont observées pour les ions  $m/z$  984 (1945) et  $m/z$  998 (1973).

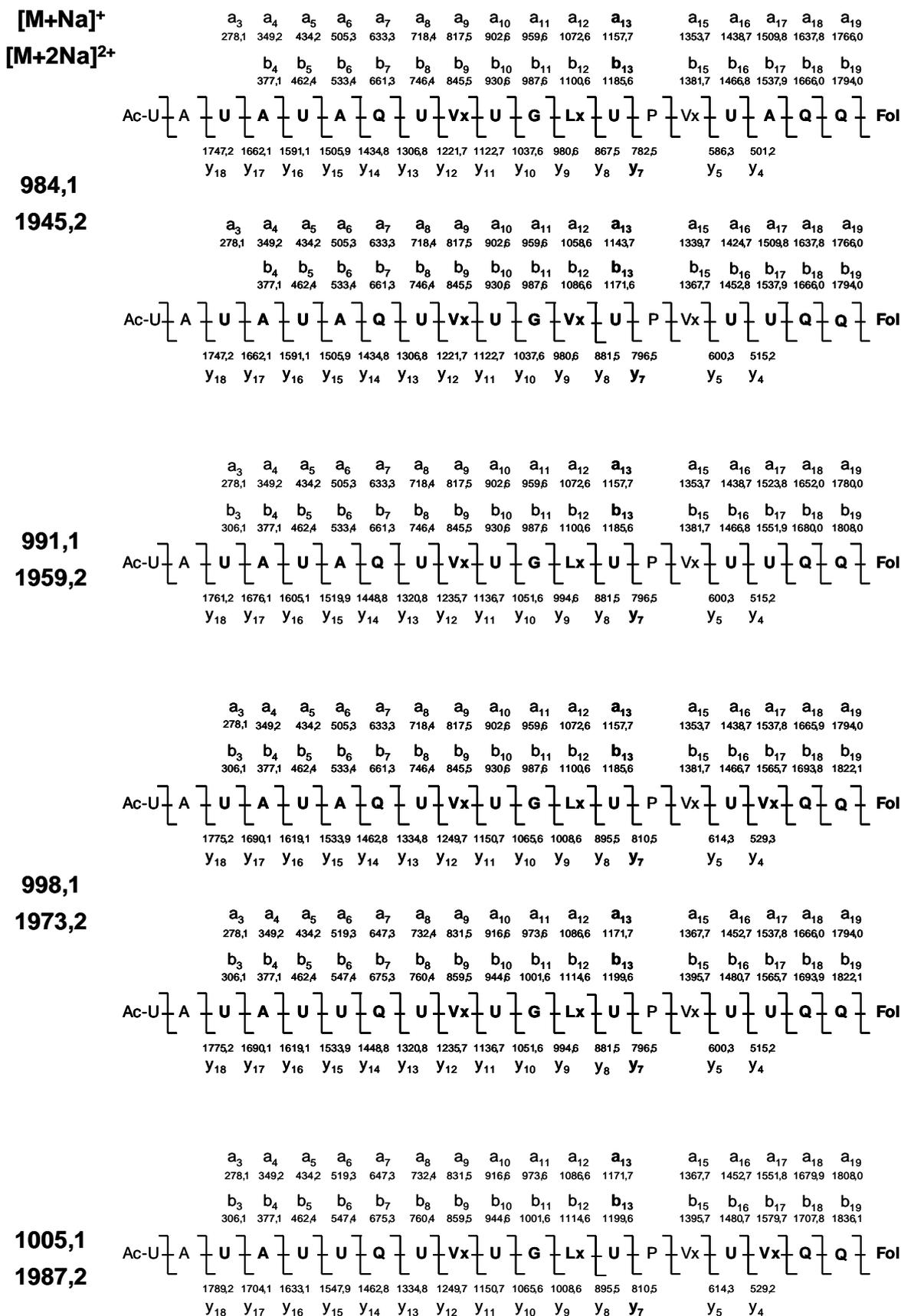


Figure 3-43 : Séquençage des peptaïbols à 20 résidus (fractions TLM3-1 à 5) par fragmentation SM<sup>2</sup> des ions adduits sodium bichargés et monochargés

### III-5-2- *Trichoderma harzianum* : peptaïbols à 18 résidus

Les peptaïbols longs ont été exclusivement isolés à partir des fractions méthanol et ont été concentrés dans la fraction purifiée THM2-5 (cf. page 202). Cette fraction correspond un mélange de peptaïbols longs à 18 résidus dont les ions observés sont similaires à ceux observés chez *T. longibrachiatum* (fraction TLA4-1, cf. Figure 3-41, page 215). Quatre adduits sodium monochargés sont identifiés, à  $m/z$  1170 (35%), 1784 (100%), 1798 (80 %) et 1812 (10%) (Figure 3-44).

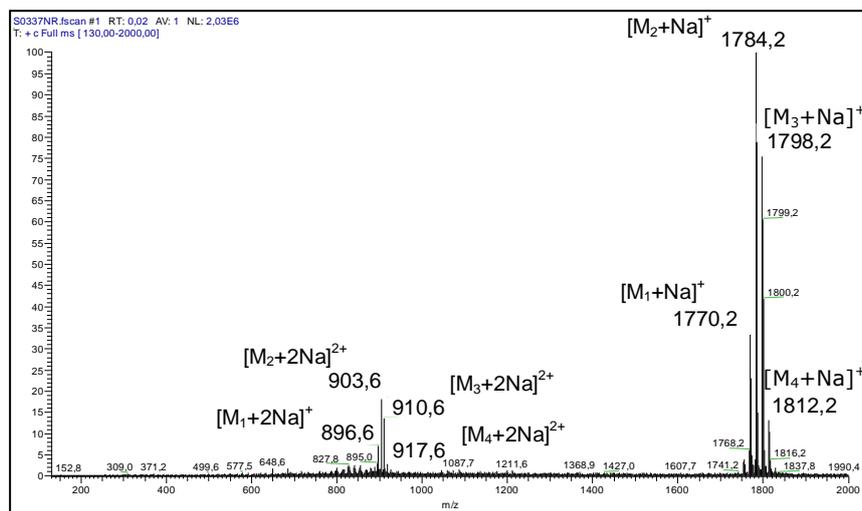


Figure 3-44 : Spectre de masse de la fraction THM2-5

Bien que très faiblement formés, les adduits sodium bichargés sont détectés et correspondent aux ions  $m/z$  896, 903, 910 et 917. Compte tenu de leur abondance, la fragmentation  $SM^2$  a été réalisée sur les adduits sodium monochargés. L'analyse séquentielle de l'ion  $m/z$  1784 est présentée Figure 3-45, page suivante.

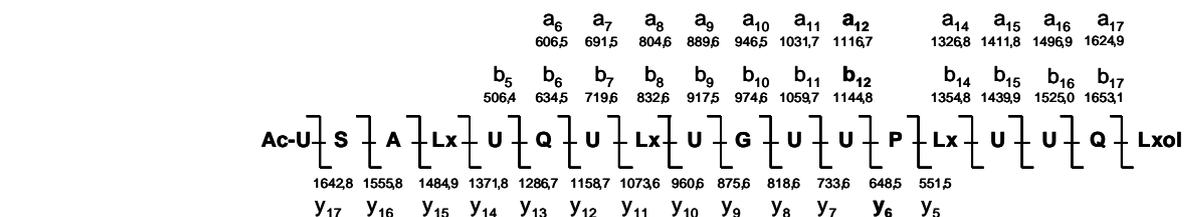
Le séquençage des autres peptaïbols ( $m/z$  1770, 1798 et 1812) a été réalisé de la même manière, à partir de la fragmentation de l'ion monochargé.

Les peptaïbols à 18 résidus produits par *T. harzianum* montrent des alignements de séquences et des résidus variables. Les résidus constants correspondent aux positions 1-4, 6, 8-10, 12-13 et 15-18. Les variations entre les peptaïbols sont dues au remplacement d'un Aib par un Vxx en position 5, 7 et 11 et d'un Vxx par un Lxx en position 14. Deux séquences microhétérogènes ont été observées pour le peptaïbol  $m/z$  1770.

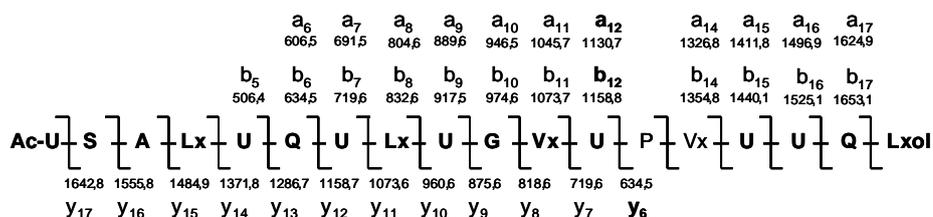
Pour les deux peptaïbols de plus haute masse, l'extrémité N-terminale est déduite, comme précédemment par comparaison :

- avec les autres peptaïbols longs produits par cette souche
- avec les séquences déjà décrites analogues

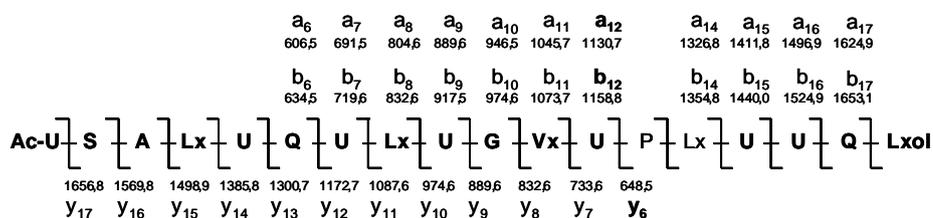
**[M+Na]<sup>+</sup> [M+2Na]<sup>2+</sup>**



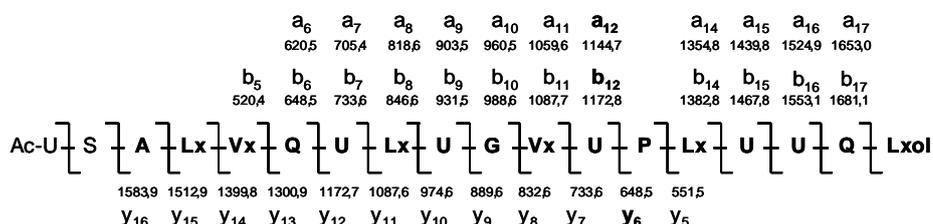
**896,6    1770,2**



**903,6    1784,2**



**910,6    1798,2**



**917,2    1812,2**

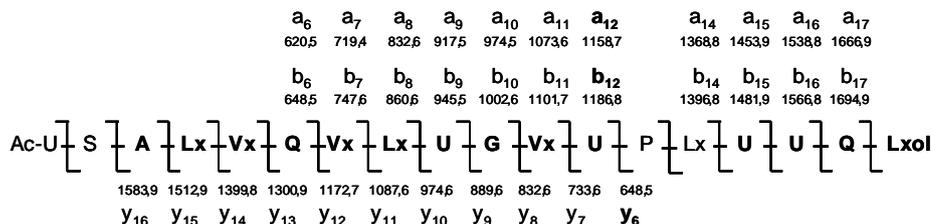


Figure 3-45 : Séquences des peptaïbols à 18 résidus (fraction THM2-5)

### III-5-3- Bilan des peptaïbols longs isolés des souches de *Trichoderma* : brachiatines, longibrachiatines et harzines

#### III-5-3-1- Peptaïbols à 18 résidus

Au total, cinq séquences ont été identifiées et séquencées, de masses moléculaires s'échelonnant de 1147 à 1789 Da (Tableau 3-25).

Tableau 3-25 : Séquences des peptaïbols à 18 résidus produits par *T. longibrachiatum* et *T. harzianum*

[M+Na] <sup>+</sup> m/z	[M+2Na] <sup>2+</sup> m/z	MM (Da)	Position															Souches		Séquences décrites					
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	TL	TH	TL	TH	
1770,2	896,6	1747	<b>Ac</b>	<b>U</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>Lx</b>	<b>U</b>	<b>Q</b>	<b>U</b>	<b>Lx</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>P</b>	<b>Lx</b>	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>Q</b>	<b>Lxol</b>	-	++	-	Harzine Ia
			Ac	U	S	A	Lx	U	Q	U	Lx	U	G	Vx	U	P	Vx	U	U	Q	Lxol	-	+	-	Harzine Ib
1784,2	903,6	1761	<b>Ac</b>	<b>U</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>Lx</b>	<b>U</b>	<b>Q</b>	<b>U</b>	<b>Lx</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>Vx</b>	<b>U</b>	<b>P</b>	<b>Lx</b>	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>Q</b>	<b>Lxol</b>	+	+++	Brachiatine I	Harzine II
1798,2	910,6	1775	<b>Ac</b>	<b>U</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>Lx</b>	<b>Vx</b>	<b>Q</b>	<b>U</b>	<b>Lx</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>Vx</b>	<b>U</b>	<b>P</b>	<b>Lx</b>	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>Q</b>	<b>Lxol</b>	+	+++	Brachiatine II	Harzine III
1812,2	917,6	1789	<b>Ac</b>	<b>U</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>Lx</b>	<b>Vx</b>	<b>Q</b>	<b>Vx</b>	<b>Lx</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>Vx</b>	<b>U</b>	<b>P</b>	<b>Lx</b>	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>Q</b>	<b>Lxol</b>	-	+	-	Harzine IV

TL : *Trichoderma longibrachiatum*, TH : *Trichoderma harzianum*

Les séquences microhétérogènes majoritaires pour chaque ion observé figurent en gras.

Abondance relative des peptaïbols, + : < 30%, ++ : comprise entre 30 et 60%, +++ : > 60%.

Les séquences de peptaïbols à 18 résidus identifiées chez les deux souches correspondent à des séquences nouvelles. Les deux séquences identifiées dans la fraction TLA4-1 chez *T. longibrachiatum* ont été nommées brachiatines I (1761 Da) et II (1775 Da). Concernant *T. harzianum*, les deux séquences microhétérogènes de même masse moléculaire (1747 Da) ont été nommées harzines Ia (majoritaire) et Ib. Les trois autres séquences, identifiées également dans la fraction THM2-5, ont été nommées harzines II, III et IV suivant leur masses moléculaires croissantes (1761, 1775 et 1789 Da). Il est probable que les brachiatines I et II soient respectivement identiques aux harzines II et III si, après analyse de la composition en AA, les résidus Vxx, Lxx et Lxxol correspondent aux mêmes isomères.

#### III-5-3-2- Peptaïbols à 20 résidus

Six séquences de peptaïbols à 20 résidus ont été identifiées uniquement chez *T. longibrachiatum* (fractions TLM3-1 à 5) pour des masses moléculaires comprises entre 1922 et 1964 Da (Tableau 3-26).

Tableau 3-26 : Séquences des peptaïbols à 20 résidus produits par *T. longibrachiatum*

[M+Na] <sup>+</sup> m/z	[M+2Na] <sup>2+</sup> m/z	MM (Da)	Position																	Souches		Séquences identifiées	Séquences similaires décrites				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	#	12	13	14	15	16	17	18	19			20	TL	TH	
1945,2	984,1	1922	<b>Ac</b>	<b>U</b>	<b>A</b>	<b>U</b>	<b>A</b>	<b>U</b>	<b>A</b>	<b>Q</b>	<b>U</b>	<b>Vx</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>Lx</b>	<b>U</b>	<b>P</b>	<b>Vx</b>	<b>U</b>	<b>A</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>Fol</b>	+	-	Longibrachiatine Ia	-
			Ac	U	A	U	A	A	Q	U	Vx	U	G	Vx	U	P	Vx	U	U	Q	Q	Fol	+	-	Longibrachiatine Ib	-	
1959,2	991,1	1936	<b>Ac</b>	<b>U</b>	<b>A</b>	<b>U</b>	<b>A</b>	<b>U</b>	<b>A</b>	<b>Q</b>	<b>U</b>	<b>Vx</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>Lx</b>	<b>U</b>	<b>P</b>	<b>Vx</b>	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>Fol</b>	+++	-	Longibrachiatine II	Trichokonine VI, Longibrachine A-I
1973,2	998,1	1950	<b>Ac</b>	<b>U</b>	<b>A</b>	<b>U</b>	<b>A</b>	<b>U</b>	<b>A</b>	<b>Q</b>	<b>U</b>	<b>Vx</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>Lx</b>	<b>U</b>	<b>P</b>	<b>Vx</b>	<b>U</b>	<b>Vx</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>Fol</b>	+++	-	Longibrachiatine IIIa	Trichokonines VII/IX, Longibrachine A-II, Suzukacilline A-10b
			Ac	U	A	U	A	U	Q	U	Vx	U	G	Lx	U	P	Vx	U	U	Q	Q	Fol	+++	-	Longibrachiatine IIIb	Trichokonine VIII, Longibrachine A-III, Trichosporine TS B-IVc	
1987,2	1005,1	1964	<b>Ac</b>	<b>U</b>	<b>A</b>	<b>U</b>	<b>A</b>	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>Q</b>	<b>U</b>	<b>Vx</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>Lx</b>	<b>U</b>	<b>P</b>	<b>Vx</b>	<b>U</b>	<b>Vx</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>Fol</b>	+	-	Longibrachiatine IV	Longibrachine A-IV

Annotations : voir Tableau 3-25

Les différentes séquences identifiées ont été nommées longibrachiatines Ia/Ib (1922 Da), II (1936 Da), IIIa et IIIb (1950) La plupart des séquences identifiées pourraient correspondre à des peptaïbols déjà décrits à condition de déterminer la nature des résidus Vxx et Lxx. Deux peptaïbols sont nouveaux et correspondent aux deux séquences de même masse moléculaire (1922 Da).

## III-6- Activités biologiques des peptaïbols

Cette étude a été réalisée dans le but de mieux évaluer le risque potentiel lié aux *Trichoderma* sp. et aux peptaïbols en zones conchylicoles. Pour cela, la neurotoxicité des peptaïbols a été évaluée par le test de toxicité aiguë sur larves de diptères et le test comportemental sur souris.

De plus, les peptaïbols, et en particulier ceux à longues séquences, sont connus pour leur large spectre d'action antibiotique et cytotoxique. Il nous a donc semblé intéressant de comparer l'activité des peptaïbols à 11 et 20 résidus pour leur activité antibiotique (antibactérienne et antifongique) et aussi cytotoxique.

Les peptaïbols à 11 résidus et 20 résidus produits par *T. longibrachiatum* ont été testés en mélanges microhétérogènes purifiés issus des fractions CLHP.

### III-6-1- Neurotoxicité

#### III-6-1-1- Résultats des tests de toxicité aiguë sur larves de diptères

Les résultats des tests de neurotoxicité sur larves de diptères sont présentés ci-dessous (Tableau 3-27)

**Tableau 3-27 : Neurotoxicité des peptaïbols à 11 et 20 résidus sur larves de diptères**

Fractions	[M+Na] <sup>+</sup> <i>m/z</i>	Neurotoxicité (CMA, µg/µL)	
<b>PC</b>	TLA3-2	1155	in.
	TLA3-3	1169	in.
	TLA3-4	1183	in.
	TLA3-5	1197	in.
	TLA3-6	1211	in.
	<b>PL</b>	TLM3-1	1945, 1959
TLM3-2		1959	3,1
TLM3-3		1973	2,5
TLM3-4		1973	3,1
TLM3-5		1959, 1973, 1987	0,1

in. : inactif

Seules les fractions CLHP de peptaïbols longs se sont avérées actives, induisant une paralysie partielle arrière de la larve. Les fractions les plus actives correspondent à la première et dernière fractions (TLM3-1 et TLM3-5). Les peptaïbols courts se sont montrés inactifs à une concentration initiale de 50 mg/mL. Aucune modification du comportement des larves n'a en effet été observée, ceci pendant les 5 min du test.

### III-6-1-2- Test comportemental sur souris

La toxicité des peptaïbols a été évaluée par le test comportemental sur souris. Compte tenu de la quantité importante de produit nécessaire pour réaliser ces tests, seulement trois peptaïbols ont été testés sur souris : le peptaïbol à 11 résidus de la fraction TLA3-5 ( $m/z$  1197) et ceux à 20 résidus des fractions TLM3-2 ( $m/z$  1959) et TLM3-3 ( $m/z$  1973). Le bilan des effets observés après injection des trois peptaïbols à différentes concentrations est présenté Tableau 3-28.

**Tableau 3-28 : Résultat du test comportemental sur souris pour les trois peptaïbols testés**

Fractions	[M+Na] <sup>+</sup> <i>m/z</i>	Concentrations (mg/kg)				
		20	15	10	5	1
PC TLA3-5	1197	difficulté respiratoire hypothermie démarche anormale hypotonie pattes postérieures prostration cyanose <b>survie</b>	-	effets similaires	-	effets très légers
PL TLM3-2	1959	difficultés respiratoires immobilisation hypothermie étirement des pattes crampes paralysie -démarche anormale prostration <b>mort 30 min</b>	effets similaires	crampes	aucun effet observé	-
PL TLM3-3	1973	difficultés respiratoires immobilisation hypothermie étirement des pattes crampes paralysie -démarche anormale prostration <b>mort 2 h</b>	-	diminution de la motilité diminution de la vigilance	aucun effet observé	-

PC : peptaïbol court ; PL : peptaïbol long,  
- : non testé

Les trois peptaïbols se sont avérés actifs sur les souris avec des effets similaires observés qui correspondaient à des difficultés respiratoires, une hypothermie et une démarche anormale due à une paralysie partielle des pattes postérieures. Toutefois, seuls les peptaïbols longs testés ont entraîné la mort de l'animal contrairement au peptaïbol court pour lequel, même aux concentrations les plus fortes, l'effet est réversible.

### III-6-1-3- Autres activités biologiques

Dans le Tableau ci-dessous sont présentées les différentes activités biologiques testées des peptaïbols à 11 et 20 résidus.

**Tableau 3-29 : Evaluation de la cytotoxicité et des activités antimicrobiennes des peptaïbols**

Fractions	[M+Na] <sup>+</sup> m/z	Cytotoxicité (Cl <sub>50</sub> )		Activité antibactérienne (CMI, µg/mL)				Activité antifongique (Cl <sub>50</sub> , µg/ml)		
		µg/mL	µmol/L	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	
PC	TLA3-2	1155	176,83 ± 0,85	156,21 ± 0,75	in.	in.	in.	in.	in.	in.
	TLA3-3	1169	59,21 ± 1,91	51,66 ± 1,67	in.	in.	in.	in.	in.	in.
	TLA3-4	1183	19,63 ± 1,58	16,92 ± 1,36	in.	in.	in.	in.	in.	in.
	TLA3-5	1197	1,41 ± 0,39	1,20 ± 0,33	in.	in.	in.	in.	in.	in.
	TLA3-6	1211	1,22 ± 0,06	1,02 ± 0,05	in.	in.	in.	in.	in.	in.
PL	TLM3-1	1945, 1959	47,76 ± 3,21	24,75 ± 1,66	-	-	-	-	-	-
	TLM3-2	1959	8,67 ± 0,16	4,47 ± 0,08	25	25	in.	in.	in.	>100
	TLM3-3	1973	4,94 ± 0,08	2,53 ± 0,04	25	25	in.	in.	in.	>100
	TLM3-4	1973	15,83 ± 0,05	8,11 ± 0,03	-	-	-	-	-	-
	TLM3-5	1959, 1973, 1987	15,77 ± 0,18	8,08 ± 0,09	-	-	-	-	-	-

in : inactif, - : non testé

Les tests de cytotoxicité ont concerné l'action de la viabilité cellulaire sur lignée cancéreuse KB. Toutes les fractions testées se sont avérées cytotoxiques. Les cytotoxicités les plus fortes correspondent aux fractions TLA3-5, TLA3-6 (peptaïbols courts) et TLM3-3 (peptaïbol long).

En ce qui concerne les tests antibactériens, seules les fractions de peptaïbols longs se sont avérées actives à 25 µg/mL soit 12,9 µmol/L sur les bactéries à gram positif.

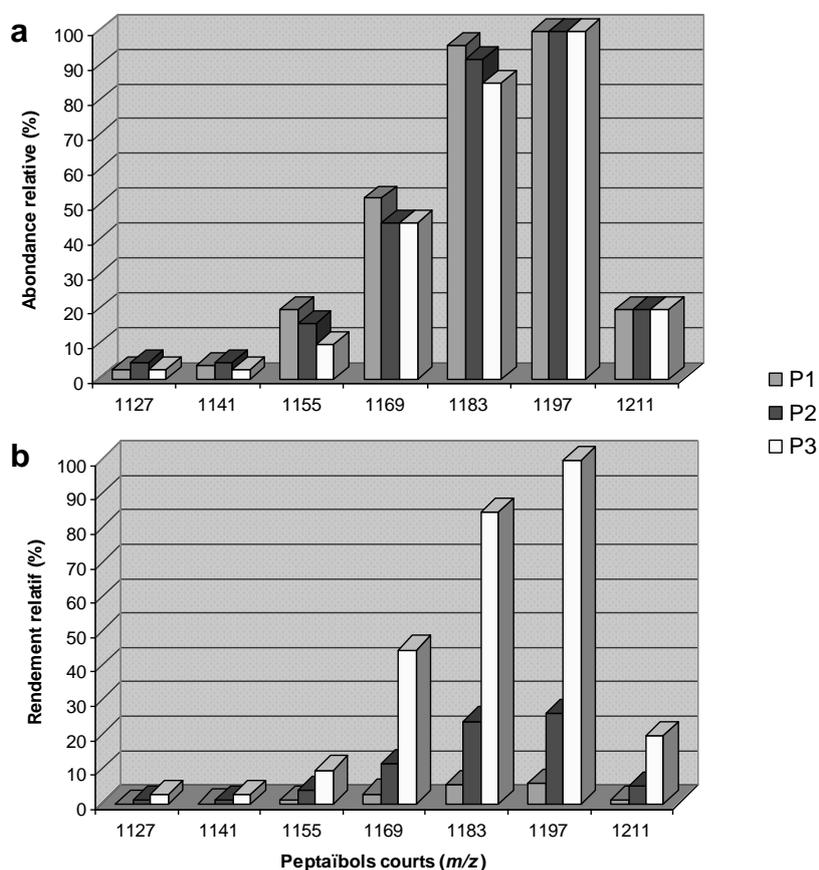
Enfin, les peptaïbols testés sont peu actifs contre la croissance fongique. Tous se sont avérés inactifs sur *Candida albicans*. Par contre, les peptaïbols longs ont montré une légère inhibition de croissance sur *Aspergillus fumigatus* de 47 et 63% respectivement pour les fractions TLM3-2 et TLM3-3 testées à 100 µg/mL (soit 51,6 et 51,3 µmol/L).

## P3-IV- Discussion

### IV-1- Obtention des peptaïbols - comparaison des protocoles

Trois protocoles ont été comparés pour l'obtention des peptaïbols. Ils différaient par le milieu de culture utilisé M1 (KM) ou DCA (M2) et par la méthode d'extraction/purification (E1 ou E2). Les résultats obtenus ont été présentés Tableau 3-22, page 199. Ils montraient clairement que le milieu de culture utilisé (KM ou DCA) et les méthodes d'extraction/purification (E1/E2) des peptaïbols influençaient les rendements de production.

Les profils de répartition des peptaïbols courts ont été déterminés pour les trois protocoles par spectrométrie de masse. La Figure 3-46 montre les profils de répartition des peptaïbols à 11 résidus obtenus pour les protocoles **P1** (M1+E1), **P2** (M2+E1) et **P3** (M2+E2).



**Figure 3-46 : Abondance (a) et rendement (b) relatifs du profil de répartition des peptaïbols courts selon le protocole utilisé**

Ces résultats mettent en évidence l'importance, à la fois, du choix du milieu de culture et des méthodes d'obtention des peptaïbols.

## IV-1-1- Comparaison des milieux

Les deux milieux comparés sont très différents : le milieu KM, utilisé précédemment au Laboratoire pour l'étude des peptaïbols des *Trichoderma* sp. est un milieu pauvre, l'apport en azote se faisant exclusivement par du nitrate d'ammonium. Dans ce cas, les champignons doivent intégralement fabriquer les acides aminés nécessaires à la production des peptaïbols. Le second milieu DCA est celui qui avait été choisi pour l'étude des lipides fongiques. C'est cette fois un milieu riche apportant de nombreux acides aminés protéinogènes provenant de l'hydrolyse de la caséine. Néanmoins, les acides aminés moins conventionnels comme l'Aib doivent être synthétisés par le champignon.

La comparaison de ces deux milieux peut être faite en analysant les résultats des protocoles **P1** et **P2**. En effet entre ces deux protocoles, seul le milieu de culture change. Il apparaît qu'avec le milieu DCA on obtient un rendement en extrait de base quatre fois supérieur à celui obtenu avec le milieu KM. Par contre, si l'on considère la Figure 3-46, il apparaît que, qualitativement, les peptaïbols courts obtenus sur les deux milieux sont quasiment les mêmes.

Ce constat indique que la biosynthèse des peptaïbols ne semble pas dépendre, qualitativement, du milieu externe. Par contre, ce dernier peut avoir une grande influence quantitative sur le résultat, la présence d'acides aminés dans le milieu de culture permettant une augmentation du rendement. Leclerc *et al.* (1998b) ont montré que la fourniture d'acides aminés particuliers tels que l'Aib pouvait avoir une influence sur la production qualitative des peptaïbols longs, ce qui ne semble donc pas être le cas pour les acides aminés protéinogènes.

## IV-1-2- Comparaison des protocoles d'extraction/purification

Dans ce cas, ce sont les protocoles **P2** et **P3** qu'il faut comparer. Ils sont en effet basés sur des cultures identiques (**M2**) mais diffèrent par les méthodes d'extraction et de purification (**E1** et **E2**).

Cette fois, les rendements d'extraction et de purification sont très en faveur du protocole « Etudes des lipides ». En effet, le rendement de fraction enrichie en peptaïbols passe de 50 mg/L à 340 mg/L, soit une augmentation de près de sept fois. De plus ce protocole permet la séparation des peptaïbols courts et des peptaïbols longs, ce qui n'était pas le cas avec l'ancien protocole utilisé. Cette augmentation de rendement est particulièrement visible Figure 3-46b.

Il semble que ce protocole, bien que plus long que celui précédemment utilisé au Laboratoire, apporte une très forte amélioration en permettant l'obtention de plus grandes quantités de peptaïbols. Il sera donc à retenir pour les études futures des peptaïbols et peut être considéré comme un progrès dans ce domaine.

### IV-1-3- Comparaison des peptaïbols entre les deux souches

Les deux souches étudiées se sont avérées productrices de peptaïbols. La méthodologie employée pour étudier les peptaïbols s'est révélée efficace et reproductible d'une espèce à l'autre. Une large gamme de peptaïbols est alors accessible, permettant une comparaison des deux souches. Des similitudes et des divergences ont pu être observées entre les deux souches, que ce soit d'un point de vue quantitatif ou qualitatif. Le bilan des rendements de production en peptaïbols est présenté Tableau 3-30.

**Tableau 3-30 Rendements de production des peptaïbols courts et longs chez les deux souches de *Trichoderma***

	<i>T. longibrachiatum</i>		<i>T. harzianum</i>	
	Masse (mg)	%	Masse (mg)	%
Extrait brut	1260		1100	
Peptaïbols courts	192	15%	86	8%
Peptaïbols longs	156	12%	178	16%
Total	348	27%	264	24%

En ce qui concerne la production totale de peptaïbols, les deux souches montrent des rendements relativement proches de 27 et 24%. Les quantités totales de peptaïbols longs produites par les deux souches sont également similaires, comprises entre 12 et 16%. La principale différence entre les deux souches concerne le rendement de production des peptaïbols courts, deux fois plus important chez *T. longibrachiatum* que chez *T. harzianum*.

Les deux souches montrent également des disparités au niveau des familles de peptaïbols rencontrés chez chacune d'elles. Quatre types de peptaïbols ont été identifiés de longueurs de chaîne différentes à 10, 11, 18 et 20 résidus. Ceux à 11 et 18 résidus sont communs aux deux souches alors que la première et la dernière famille (10 et 20 résidus) ont été mises en évidence uniquement chez *T. longibrachiatum*.

#### IV-1-3-1- Peptaïbols à 11 résidus

Les peptaïbols à 11 résidus sont produits en quantités relativement importantes par les deux souches étudiées. Ce type de peptaïbols n'a été décrit que chez des moisissures du genre *Trichoderma* (ou leurs téléomorphes du genre *Hypocrea*). Il est donc probable qu'une peptide synthétase produisant des peptides de cette longueur soit une caractéristique de ces genres. Il est donc logique de penser que ces peptaïbols à 11 résidus peuvent être considérés comme des biomarqueurs du développement des champignons de ces genres s'ils sont retrouvés dans le milieu naturel. Leur étude systématique serait intéressante en chimiotaxonomie du genre *Trichoderma* dont les espèces sont très proches et difficiles à différencier. Pour cela plusieurs points sont à étudier : leur profil de répartition, leur composition en résidus et leurs séquences.

#### IV-1-3-1-1- Comparaison des profils de répartition des peptaïbols à 11 résidus

Le premier point à étudier est la comparaison des profils globaux de production des peptaïbols à 11 résidus. Ils sont regroupés en un nombre réduit de mélanges microhétérogènes donnant des ions adduits sodium monochargés à des valeurs  $m/z$  comprises entre 1127 et 1225. Le profil de leur répartition est variable comme le montre la Figure 3-47 pour les deux souches étudiées.

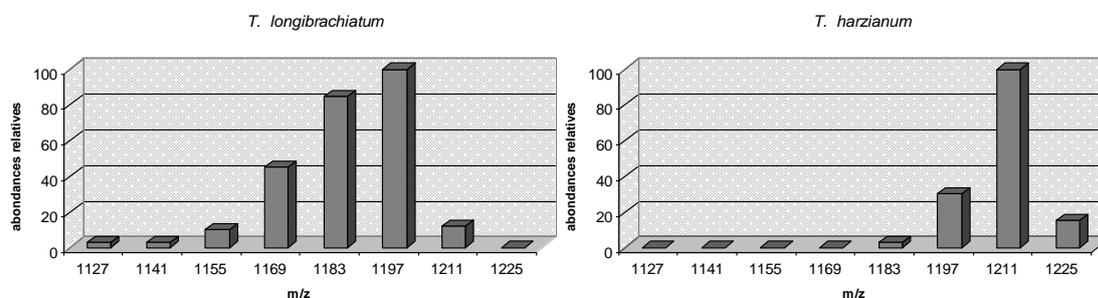


Figure 3-47 : Profils de répartition des peptaïbols à 11 résidus pour les deux souches étudiées

La pertinence de ces profils semble excellente. En effet, comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, il apparaît que le milieu de culture et donc les conditions externes n'ont pas d'influence sur le profil (cf. Figure 3-46a, page 224). Ce profil serait donc caractéristique. Néanmoins, le nombre trop réduit de données ne nous permet pas de dire s'il est caractéristique d'une souche, d'une variété ou d'une espèce de *Trichoderma*. Seule une étude sur un grand nombre de souches correctement identifiées permettra de répondre à cette question.

Il apparaît que les profils des deux souches étudiées sont très différents : la souche de *T. longibrachiatum* produit une plus grande variété de peptaïbols que celle de *T. harzianum*. Les majoritaires sont ceux à  $m/z$  1183 et 1197 chez *T. longibrachiatum* alors que pour la seconde souche le peptaïbol majoritaire est celui à  $m/z$  1211. Pour aller plus loin dans la comparaison, le séquençage des peptides obtenus est nécessaire.

#### IV-1-3-1-2- Séquençage et acides aminés constitutifs

Globalement, pour les deux souches étudiées, 37 séquences ont été identifiées pour des masses s'échelonnant de 1118 à 1202 Da dont 30 pour la seule souche de *T. longibrachiatum*. C'est, à ce jour, le plus grand nombre de séquences homologues observées en une fois. Sur l'ensemble, 22 de ces séquences sont nouvelles. Cette richesse de structures confirme l'intérêt du protocole de production/extraction suivi qui permet d'obtenir des quantités beaucoup plus importantes de peptaïbols que les techniques conventionnellement utilisées. Cette méthodologie autorise ainsi une étude plus poussée de la microhétérogénéité particulièrement développée pour les peptaïbols à 11 résidus.

Les séquences identifiées appartiennent toutes à une même famille peptidique basée sur le modèle **Ac-U-X-X-U-P-X-X-U-P-Xol** où **X** représente les résidus variables aux positions 2, 3, 4, 7, 8 et 11 (excepté pour l'ion  $m/z$  1225 pour lequel un Vxx est acétylé à la place de l'Aib en position 1). Comme nous l'avons déjà évoqué dans le chapitre relatif aux peptaïbols courts déjà publiés, la plupart des peptaïbols à 11 résidus déjà isolés sont basés sur ce même modèle (cf. Figure 3-1 et Tableau 3-5, page 149). Dans le cas des séquences observées, les parties variables sont constituées par des résidus Asn ou Gln en position 2, Vxx ou Lxx aux positions 3, 4, 7 et 8 et Vxxol ou Lxxol en 11. Il est important de noter que l'Ala ou la Ser présentes en position 2 dans certains peptaïbols comme les trichobrévines (Degenkolb *et al.*, 2006) ne sont pas observées dans notre étude. La Figure 3-48 présente le modèle global de séquence des peptaïbols à 11 résidus rencontrés chez les deux souches étudiées.

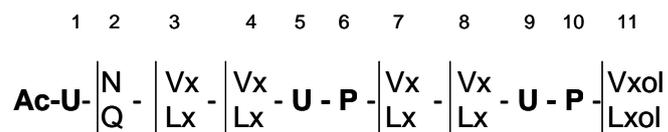


Figure 3-48 : Schéma général des séquences des peptaïbols à 11 résidus identifiés

L'analyse par CPG/SM a permis de montrer que tous les Vxx correspondaient à des résidus Val. Par contre elle a également montré la présence simultanée de résidus Leu et Ile ne permettant pas de leur affecter une position exacte dans les molécules mis à part quand ils se présentent sous la forme réduite Leuol et Ileol.

Le Tableau 3-31 présente le calcul du nombre de séquences possibles basées sur ce modèle.

Tableau 3-31 : Composition en résidus variables et nombre total de séquences microhétérogènes théoriques des peptaïbols à 11 résidus de *T. longibrachiatum* et *T. harzianum*

[M+Na] <sup>+</sup> <i>m/z</i>	Nombre de résidus variables				Nombre total de séquences possibles	
	N	Q	Vx/Vxol	Lx/Lxol	total	
1211	0	1	0	5	1	1
1197	1	0	0	5	1	6
	0	1	1	4	5	
1183	1	0	1	4	5	15
	0	1	2	3	10	
1169	1	0	2	3	10	20
	0	1	3	2	10	
1155	1	0	3	2	10	15
	0	1	4	1	5	
1141	1	0	4	1	5	6
	0	1	5	0	1	
1127	1	0	5	0	1	1

Il faut noter que le nombre total de séquences possibles pour le modèle donné (Figure 3-48) est de 64 si l'on ne différencie pas les résidus Vxx en Val et Iva et les résidus Lxx en Leu et Ile. Par contre, dans le cas contraire, le nombre total possible de séquence passe à 2048 possibilités.

Chez *T. harzianum*, sept séquences ont pu être identifiées sur les 32 possibles présentant une Gln en position 2 (l'ion *m/z* 1225 n'est pas pris en compte dans ce modèle). Toutefois, le peptaïbol 1183, observé en mode Fullscan mais trop faiblement présent pour permettre un séquençage efficace pourrait correspondre à un mélange maximum de 10 séquences microhétérogènes, en supposant qu'il possède une Gln, trois Vxx et deux Lxx.

Les deux souches montrent des profils de peptaïbols très divergents. Ceci est mis en évidence par la comparaison de la répartition des résidus variables aux positions 2 (N/Q), 3, 4, 7, 8 (Vx/Lx) et 11 (Vxol/Lxol) (Tableau 3-32).

**Tableau 3-32 : Répartition des résidus variables aux positions 2, 3, 4, 7, 8 et 11 (amino alcool)**

Positions		2	3	4	7	8	11	total
Résidus		A / S / N / Q	Vx / Lx	Vx / Lx	Vx / Lx	Vx / Lx	Vxol / Lxol	Vx-Vxol / Lx-Lxol
<i>T. longibrachiatum</i>	Séquences totales	0 / 0 / 94 / 6	47 / 53	47 / 53	47 / 53	40 / 60	50 / 50	46 / 54
	Séquences majoritaires	0 / 0 / 91 / 9	50 / 50	34 / 66	8 / 92	34 / 66	58 / 42	33 / 67
<i>T. harzianum</i>	Séquences totales	0 / 0 / 0 / 100	17 / 83	17 / 83	17 / 83	17 / 83	17 / 83	17 / 83
	Séquences majoritaires	0 / 0 / 0 / 100	25 / 75	25 / 75	0 / 100	0 / 100	25 / 75	15 / 85
	Séquences publiées	18 / 13 / 35 / 34	53 / 47	37 / 63	2 / 98	0 / 100	31 / 69	25 / 75

Les variations entre les deux souches au niveau de la répartition des résidus variables pourraient confirmer des voies de biosynthèse spécifiques pour chacune des souches.

Considérons dans un premier temps toutes les séquences identifiées pour *T. longibrachiatum*, 28 séquences sur 30 présentent une Asn en position 2, équivalant à 94% de présence. Chez *T. harzianum*, par contre, les séquences analysées ont toutes montré une Gln à cette position. Cela indique que la première souche va incorporer préférentiellement en position 2 de l'Asn contrairement à la seconde. Ces spécificités en position 2 diffèrent de ce qui est observé chez les séquences publiées où les proportions N/Q sont similaires (35 et 34% respectivement).

De même, l'incorporation des résidus Vxx/Lxx aux positions 3, 4, 7, 8 et des Vxxol/Lxxol en position 11 peuvent être comparées. Chez *T. longibrachiatum*, compte tenu que pratiquement toutes les séquences microhétérogènes possibles aient été identifiées (28/32), il est logique de trouver des proportions similaires de Vxx/Lxx aux positions 3, 4, 7 et 8 et de leur forme réduite en position 11. Chez *T. harzianum*, les cinq positions montrent une incorporation préférentielle des résidus Lxx (83%).

Les séquences majoritaires pour chaque ion sont au nombre de 11 pour *T. longibrachiatum* et de quatre pour *T. harzianum*. Il apparaît clairement des positions plus spécifiques que d'autres.

Ainsi, chez *T. longibrachiatum*, les positions 3 et 4 sont peu spécifiques et montrent des proportions similaires de Vxx/Lxx avec toutefois une légère prédominance des Lxx en position 4 (64%). Des proportions proches sont observées chez les séquences publiées (63%). Les positions 7 et 8 sont plus spécifiques à l'incorporation des Lxx, comme c'est le cas chez la plupart des séquences décrites où peu de Vxx ont été observés. Lorsqu'au moins deux résidus Vxx sont présents dans une séquence, comme c'est le cas pour les ions *m/z* 1141, 1155 et 1169, l'un des deux Vxx est préférentiellement incorporé en position 11 et réduit en amino alcool.

Chez *T. harzianum*, les séquences majoritaires montrent, comme c'était le cas pour *T. longibrachiatum*, des positions 3-4 moins légèrement spécifiques (25/75) que 7-8 (0/100), en adéquation avec les séquences déjà publiées (2/98 et 0/100 respectivement pour les positions 7 et 8).

La comparaison de la répartition des résidus variables entre les deux souches permet de définir deux types de séquences caractéristiques des deux souches étudiées. Le premier type de séquence concerne les peptaïbols dont les peptides synthétases incorporent principalement des résidus Asn en position 2 et des Lxx aux autres positions variables, définissant des séquences « Asn-Lxx ». Le deuxième type de séquence, correspondant aux peptaïbols produits par *T. harzianum*, pourrait être nommé « Gln-Lxx ». En effet, les séquences produites présentent toutes un résidu Gln en position 2 et principalement des Lxx aux autres positions variables. Bien que les différents peptaïbols soient présents en mélange dans la

fraction THA3-2 pour cette souche, l'ion  $m/z$  1211 prédomine sur les autres ions ( $m/z$  1197, 1225). La spécificité pour les Lxx chez cette souche est plus importante que chez *T. longibrachiatum*, ce qui explique un plus faible nombre de séquences microhétérogènes observées.

Ces types de séquences Asn/Lxx et Gln/Lxx révèlent donc des voies de biosynthèse propres à chacune des deux souches. Les peptaïbols sont produits par des peptides synthétases constituées de plusieurs modules dont le nombre correspond à celui du nombre des résidus souhaité (Reiber *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2005). Il apparaît donc clairement d'une part, que les modules sont plus ou moins spécifiques à l'incorporation d'un acide aminé particulier et d'autre part que les peptides synthétases diffèrent entre les deux souches, notamment au niveau du deuxième module qui serait responsable de la reconnaissance et de l'incorporation de l'Asn ou de la Gln. Une étude systématique de la production de peptaïbols à 11 résidus devrait donc être très intéressante pour mieux comprendre le fonctionnement de ces enzymes.

Concernant les séquences analysées en CPG/SM, (*T. longibrachiatum*), les résidus Vxx et Vxxol ont été déterminés comme étant respectivement Val et Valol. Cela est en concordance avec la plupart des séquences décrites excepté l'harzianine HB-I qui présente une Iva en position 7 (Augeven-Bour *et al.*, 1997).

Pour les résidus Lxx, les isomères Leu et Ile ont été observés conjointement en CPG/SM pour certains peptaïbols, ne nous permettant donc pas de déterminer leur localisation respective au niveau de la séquence. C'est également le cas pour de nombreuses séquences publiées chez lesquelles les résidus Lxx sont restés indéterminés. Toutefois, il est intéressant de noter que pour les séquences connues dont la distinction Leu/Ile a pu être effectuée, le résidu Ile est principalement observé en position 3 (90%). Aux positions 4 et 7 les deux isomères sont présents en proportion équivalente alors qu'en position 8 le résidu Leu prédomine.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de biosynthèse mis en place chez les peptaïbols à 11 résidus, l'analyse de la composition en acides aminés devra être complétée pour les trichodharzines. Pour cela, les peptaïbols majoritaires devront subir au préalable une purification supplémentaire en CLHP. En ce qui concerne la distinction des résidus Leu/Ile observés chez les trichobrachines, leurs positions exactes ne pourront être déterminées que par analyse RMN, ce qui ne pourra être possible que pour des séquences isolées ce qui sera difficile à réaliser pour des séquences microhétérogènes.

### IV-1-3-2- Peptaïbols à 9 et 10 résidus chez *T. longibrachiatum*

L'analyse en spectrométrie de masse des différentes fractions issues de la CLHP préparative sur TLA3-1 a permis de mettre en évidence des peptides constitués de 9 et 10 résidus dont le début (positions 1 à 7) était identique aux séquences de la famille des trichobrachines à 11 résidus. La suite des séquences était, par contre, beaucoup plus variable et plusieurs types de terminaisons C-terminales ont pu être mis en évidence ou supposés.

Sachant que ces peptides correspondent d'une part à des fractions très minoritaires, et d'autre part ont tous comme point commun une partie de séquence caractéristique des peptaïbols à 11 résidus, nous avons émis l'hypothèse qu'il pourrait s'agir de peptaïbols pour lesquels différents types d'erreur auraient été commises au cours de la biosynthèse.

Compte tenu des modèles de biosynthèse décrits pour les peptaïbols (Reiber *et al.*, 2003), des intermédiaires de biosynthèse correspondants à des peptides plus courts ne doivent normalement pas être observés. En effet, les peptaïbols se séparent du complexe multienzymatique uniquement après réduction

du dernier résidu en son amino-alcool correspondant. La présence de peptaïbols ou peptides similaires à 9 et 10 résidus ne pourrait donc s'expliquer que par le fait que des erreurs soient commises au cours de la biosynthèse. Ces erreurs surviendraient principalement au niveau de la reconnaissance et/ou de l'incorporation des derniers acides aminés en positions C-terminales (Tableau 3-33).

**Tableau 3-33 : Terminaisons C-terminales possibles pour les peptides à 9 et 10 résidus produits par *T. longibrachiatum***

Position											Hypothèses				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11					
Partie peptidique microhétérogène commune							U	P					erreur en position 8 : <b>U</b> à la place <b>Lx/Vx</b>		
							A	Pol					erreur en position 8 : <b>A</b> à la place de <b>Lx/Vx</b> et en position 9 : <b>Pol</b> à la place de <b>P</b>		
AcU N Vx Vx U P Vx Q Lx Lx Lx							U	P	Vxol					oubli de l'incorporation d'un résidu <b>Vx/Lx</b> en position 8	
							U	P	Lxol						
							Vx	A	Pol					erreur en position 9 : <b>A</b> à la place de <b>U</b> et réduction de <b>P</b> en <b>Pol</b>	
							Lx	A	Pol						
							Vx	U	Pol					erreur en position 10 : réduction de <b>P</b> en <b>Pol</b>	
							Lx	U	Pol						
AcU N Vx Vx U P Vx Q Lx Lx Lx							Vx	U	P	Vxol					séquences normales (11 résidus)
							Lx	U	P	Lxol					

Les erreurs se situeraient au niveau du module de la position 8 avec incorporation d'un Aib ou d'une Ala à la place d'un Vxx/Lxx. Dans ce cas, il pourrait y avoir soit avortement de la séquence après le 9<sup>ème</sup> résidu qui serait néanmoins en général hydroxylé, soit terminaison de la séquence engendrant un peptaïbol « normal » mais constitué de 10 résidus.

Une erreur pourrait également survenir lors de la biosynthèse en position 9 par remplacement d'un Aib par une Ala entraînant alors l'hydroxylation de la Pro en position 10 et arrêt de la synthèse par séparation du peptide de la peptide synthétase.

Enfin cette hydroxylation pourrait également se produire de manière inopinée sur la Pro en position 10, entraînant également l'arrêt de la synthèse.

Certaines suppositions, comme par exemple la présence de Prool, devront être confirmées par l'analyse de la composition en acides aminés (CPG/SM) accompagnées d'étapes supplémentaires de purification afin d'obtenir des fractions plus homogènes.

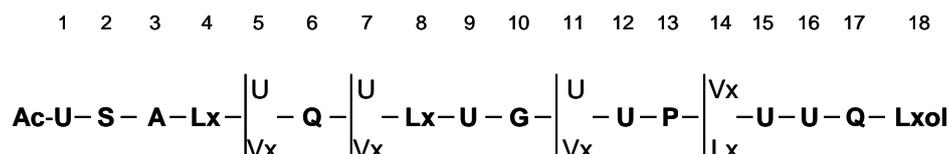
Contrairement à l'hypothèse émise par Rebuffat *et al.* (2000) sur l'existence de peptaïbols à 10 résidus se terminant par un Prool qui seraient des intermédiaires de biosynthèses des peptaïbols à 11 résidus et des pseudokonines (peptaïbiotiques de 8 et 10 résidus terminés respectivement par un groupement hydroxy-cétopipérazine et un Pro-NH<sub>2</sub>), nous pensons en fait qu'il s'agirait plutôt de peptides terminés résultant d'erreur de synthèse.

### IV-1-3-3- Peptaïbols longs

Des peptaïbols à 18 et 20 résidus ont été isolés au cours de cette étude. Les premiers sont communs aux deux souches bien que très minoritairement présents chez *T. longibrachiatum*. Les seconds ne sont pas produits par *T. harzianum*.

#### IV-1-3-3-1-Peptaïbols à 18 résidus

Comme pour les peptaïbols à 11 résidus, un modèle de séquence peut être proposé (Figure 3-49).



**Figure 3-49 : Caractéristiques des séquences de peptaïbols à 20 résidus des souches *T. longibrachiatum* et *T. harzianum***

Contrairement aux peptaïbols courts à 11 résidus observés chez les deux souches, les peptaïbols longs présentent beaucoup moins de microhétérogénéité de séquences. En effet, peu de combinaisons entre les résidus variables sont observées. Deux peptaïbols ont été observés chez *T. longibrachiatum*, correspondant aux ions  $m/z$  1784 (70%) et 1798 (100%). Ces deux peptaïbols sont également retrouvés chez *T. harzianum* (respectivement à 100 et 70%), mais sont complétés de deux peptaïbols supplémentaires ( $m/z$  1770 et 1812).

Ces peptaïbols présentent des séquences très similaires qui diffèrent les unes des autres par le remplacement d'un Aib par un Vxx aux positions 5, 7, et 11 et d'un Vxx par un Lxx en position 14. Toutes les autres positions présentent des résidus constants.

Chez *T. longibrachiatum*, les peptaïbols à 18 résidus correspondent à des peptides très minoritaires par rapport à la production des peptaïbols à 11 et 20 résidus. Il est intéressant d'observer que leurs séquences sont similaires à celles identifiées chez *T. harzianum*.

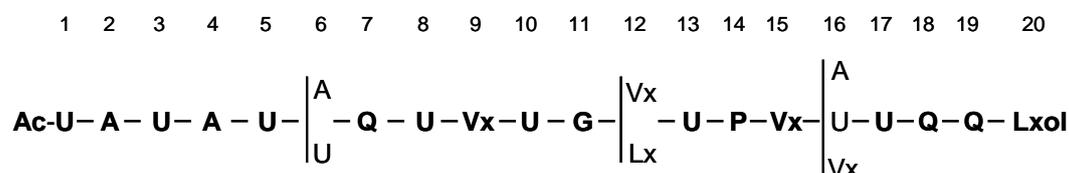
Chez *T. harzianum*, par contre, les peptaïbols à 18 résidus constituent l'unique famille de peptaïbols longs. Cinq séquences ont été identifiées dont deux microhétérogènes pour l'ion  $m/z$  1770.

Les séquences de peptaïbols à 18 résidus identifiées chez les deux souches correspondent à des séquences nouvelles. Deux peptaïbols à 18 résidus déjà décrits sont très similaires : il s'agit des l'hypomurocine B-II (1733 Da,  $m/z$  1754) et B-V (1747 Da,  $m/z$  1770) isolées d'*Hypocrea muroiana* (Becker *et al.*, 1997). L'hypomurocine B-II présente une masse moléculaire plus faible que celles des séquences identifiées. L'hypomurocine B-V, dont la masse moléculaire correspond à celles des deux séquences microhétérogènes de l'ion  $m/z$  1770, diffère d'au moins un résidu dans l'alignement des séquences.

D'autres peptaïbols, très proches, peuvent présenter les mêmes masses moléculaires que ceux produits par les deux souches comme la famille des trichokindines isolées de *T. harzianum* (Iida *et al.*, 1994). Néanmoins leurs séquences présentent toutes une Ala en position 10, ce qui les différencie des peptaïbols isolés des souches de *T. longibrachiatum* et *T. harzianum* pour lesquelles une Gly est retrouvée constamment à cette position.

#### IV-1-3-3-2- Peptaïbols à 20 résidus : *T. longibrachiatum*

Les peptaïbols à 20 résidus ont été isolés uniquement de la souche de *T. longibrachiatum* chez laquelle ils sont produits en proportion importante (12% du poids de l'extrait brut). Six séquences ont été décrites pour quatre masses moléculaires comprises entre 1922 et 1964 Da. Le modèle de séquence est présenté ci-dessous (Figure 3-50).



**Figure 3-50 : Caractéristiques des séquences de peptaïbols à 20 résidus des souches *T. longibrachiatum* et *T. harzianum***

Ces séquences montrent peu de microhétérogénéité et diffèrent entre elles au niveau des positions 6 (A/U), 12 (Vx/Lx) et 16 (A/U/Vx). Deux séquences microhétérogènes ont été observées pour les ions  $m/z$  984 et 998. Pour les autres ions, une seule séquence a été identifiée en SM<sup>2</sup>. Sur les six séquences identifiées, cinq sont similaires aux trichokonines (*T. koningii*), longibrachines (*T. longibrachiatum*), trichosporines (*T. polysporum*), trichocellines (*T. viride*) et suzukicillines (Iida *et al.*, 1990; Wada *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1995; Leclerc *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que les peptaïbols majoritairement produits par cette souche (ions  $m/z$  991 et 998) sont analogues aux longibrachines, produites par une espèce terrestre de *T. longibrachiatum*.

Les deux premières séquences (ion  $m/z$  984) correspondent à deux nouvelles séquences. Plusieurs séquences présentant la même masse (1922 Da) ont été décrites telles que les paracelsines B/C (Brückner et Graf, 1983), la saturnisporine I (Leclerc *et al.*, 1998b), les trichocellines A-I/A-III (Wada *et al.*, 1994) ou encore la trichokonine II-b (Huang *et al.*, 1995). Néanmoins, toutes ces séquences diffèrent de deux résidus avec la séquence décrite chez *T. longibrachiatum*.

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment (*cf.* Tableau 3-26, page 220), les ions  $m/z$  991 et 998 correspondent aux peptaïbols à 20 résidus majoritairement produits par *T. longibrachiatum*. Or il est intéressant de constater que ces mêmes ions ont été mis en évidence récemment par le Laboratoire, dans l'environnement marin au niveau d'échantillons de sédiments et de moules. (Poirier *et al.*, 2007a). Ces résultats confirment l'intérêt d'étudier ces peptaïbols à 20 résidus comme **biomarqueurs** du genre *Trichoderma* dans le milieu naturel marin.

#### IV-1-3-4- Bilan global des peptaïbols produits par les deux souches de *Trichoderma*

Le point commun principal entre les deux souches de *Trichoderma* est la présence de deux grandes familles de peptaïbols : à courtes et longues séquences. Les principaux ions observés en spectrométrie de masse ainsi que leur abondance relative sont présentés Tableau 3-34.

**Tableau 3-34 : Abondance relative des peptaïbols produits par les deux souches (SM, Fullscan)**

Groupe de peptaïbols	$m/z$ [M+Na] <sup>+</sup>	Abondance relative par groupe de peptaïbols (%)	
		<i>T. longibrachiatum</i>	<i>T. harzianum</i>
<b>11 résidus</b>			
	1141	5	–
	1155	10	–
	1169	45	–
	1183	<b>85</b>	5
	1197	<b>100</b>	28
	1211	10	<b>100</b>
	1225	–	15
<b>18 résidus</b>			
	1770	–	35
	1784	<b>70</b>	<b>100</b>
	1798	<b>100</b>	<b>70</b>
	1812	–	10
<b>20 résidus</b>			
	1945	5	–
	1959	<b>80</b>	–
	1973	<b>100</b>	–
	1987	5	–

tr. : trace (peptaïbols minoritaires)

L'étude de ces deux souches montre la grande disparité de profils de production de peptaïbols. Comme nous l'avons déjà signalé pour les peptaïbols courts, l'étude de ces profils sur deux nombreuses souches correctement identifiées pourra permettre de connaître leur intérêt éventuel en chimiotaxonomie.

## IV-2- Activités biologiques

### IV-2-1- Risque toxinique

Le risque toxinique lié à la présence des peptaïbols en milieu marin est confirmé par les tests réalisés sur souris. Bien que les deux types de peptaïbols testés se soient révélés actifs, seules les injections de peptaïbols longs se sont avérées létales chez les souris (*cf.* Tableau 3-28, page 222). Le potentiel toxigène des peptaïbols longs est corroboré par les tests réalisés sur les larves de diptères caractérisant la neurotoxicité (*cf.* Tableau 3-27, page 221). En effet, ces derniers se sont montrés positifs, entraînant une paralysie arrière des larves, confirmant les travaux antérieurs réalisés au Laboratoire (Landreau *et al.*, 2002). Par contre aucune activité n'a été observée pour les peptaïbols courts.

Il est intéressant d'observer que les fractions purifiées actives constituées d'un mélange de deux ou de plusieurs peptaïbols longs (fractions TLM3-1 et TLM3-5) sont globalement 10 fois plus actives que celles ne contenant qu'un seul peptaïbol (fractions TLM3-2, TLM3-3 et TLM3-4). Ces faits pourraient traduire la présence d'un effet synergique peut-être par association de différentes molécules. La formation des pores serait-elle plus efficace dans ces conditions ?

Au vu des ces résultats et compte tenu du fait que les peptaïbols à 20 résidus ont été mis en évidence dans le milieu marin dans les sédiments et les coquillages (Poirier *et al.*, 2007a), il peut être considéré que leur présence en zones conchylicoles pourrait représenter un risque toxinique réel pour les coquillages et/ou leurs consommateurs. La toxicité sur souris observée pour les peptaïbols longs peut, peut-être, expliquer les positivités des tests sur souris restées sans explication et qui ont été à l'origine de nos recherches sur les champignons marins. Malheureusement, les échantillons de l'époque n'ont pas été conservés et il est donc aujourd'hui impossible d'y rechercher la présence de peptaïbols.

### IV-2-2- Autres activités

Les peptaïbols ont également été testés pour leurs activités cytotoxiques et antimicrobiennes (*cf.* Tableau 3-29, page 223). Les peptaïbols courts se sont révélés inactifs sur les tests antibactériens et antifongiques contrairement aux peptaïbols longs. L'étude de la cytotoxicité des peptaïbols montre également des disparités sur cellules KB. Les peptaïbols courts présentent des cytotoxicités très variables en fonction de leur masse moléculaire contrairement aux peptaïbols longs dont les  $CI_{50}$  sont plus constantes. Il est intéressant de noter qu'il s'agit de la première description d'activité cytotoxique pour des peptaïbols à 11 résidus qui jusqu'ici avaient principalement été testés pour leur activités antibactériennes et antimycoplasmiques (Rebuffat *et al.*, 1999; Rebuffat *et al.*, 2000).

## IV-2-3-Relation structure/activité

Cette évaluation toxilogique et pharmacologique des peptaïbols a confirmé les travaux précédemment décrits dans la littérature, en montrant que deux paramètres influençaient principalement leur activité : la **longueur** et l'**hydrophobie** de la chaîne peptidique.

### IV-2-3-1- Longueur de chaîne

L'influence de la longueur de chaîne a été clairement observée par les différents résultats obtenus qui montrent des disparités importantes entre peptaïbols courts et longs (Tableau 3-35).

**Tableau 3-35 : Bilan de l'étude pharmacologique des peptaïbols de *T. longibrachiatum***

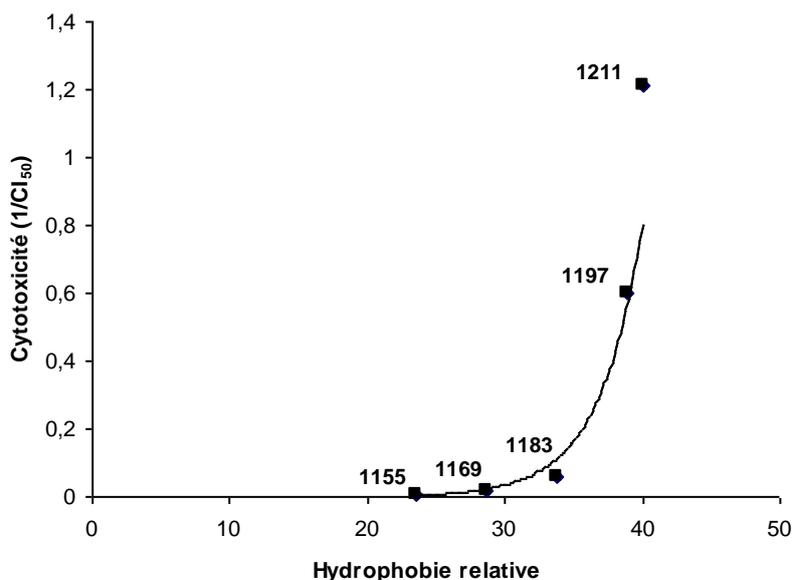
Tests biologiques	Peptaïbols courts	Peptaïbols longs
Toxicité sur souris	++	+++ mort
Neuroactivité sur larves	-	++
Activité antibactérienne	-	+
Activité antifongique	-	+/-
Cytotoxicité	++	++

Seules la toxicité sur souris et la cytotoxicité sur cellules KB ont été observées pour les deux types de peptides. Les peptaïbols longs, s'avèrent plus toxiques, notamment sur souris et sur larves. Ils présentent également une légère activité antimicrobienne. Ainsi, ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle les peptaïbols à 11 résidus ne possèderaient pas une longueur de chaîne suffisamment importante pour pénétrer dans les membranes microbiennes (Rebuffat *et al.*, 2000).

### IV-2-3-2- Hydrophobie des séquences

Le deuxième critère à prendre en compte est l'hydrophobie. Le test de cytotoxicité sur cellules KB, réalisé sur une série de peptides à 11 résidus dérivant tous du même squelette peptidique, a permis de mettre en évidence que l'hydrophobie globale des peptaïbols pouvait avoir une influence sur l'activité biologique. En effet, pour les cinq mélanges microhétérogènes de peptaïbols à 11 résidus testés, il est intéressant de constater que plus la masse moléculaire augmente, et donc l'hydrophobie de la molécule, plus l'activité cytotoxique est importante. La substitution des Vxx par des Lxx et des Asn par des Gln, correspondant à l'ajout de groupement méthylène sur les chaînes latérales sans modification du squelette peptidique, entraîne une augmentation de leur caractère hydrophobe.

L'hydrophobie relative des peptaïbols testés a été calculée en se basant sur l'échelle décrite par Tossi *et al.* (2002) et en considérant uniquement les résidus variables Vxx, Lxx, Asn et Gln avec pour valeurs respectives 4,1 ; 9,2 ; -7.1 et -6.0. Une corrélation exponentielle nette ( $r = 0,979$ ,  $n = 5$ ) entre l'activité cytotoxique et l'hydrophobie relative est observée (Figure 3-51, page suivante).



**Figure 3-51 : Relation entre la cytotoxicité sur cellules KB ( $1/CI_{50}$ ) et l'hydrophobie relative des peptaïbols courts microhétérogènes de *T. longibrachiatum* (fractions TLA3-2 à 6)**

Ces résultats confirment que l'hydrophobie est un facteur à prendre en considération dans l'activité biologique des peptaïbols, en relation étroite avec la faculté des peptaïbols à s'insérer dans les membranes biologiques.

Pour les peptaïbols longs testés, la cytotoxicité est plus constante. En effet, l'ajout ou la suppression d'un groupement méthylène sur les chaînes latérales de ces grosses molécules modifie beaucoup moins l'hydrophobie globale.

Au vu de ces résultats, il semblerait que l'utilisation du modèle KB présente un réel intérêt pour mieux comprendre le mécanisme d'action des peptaïbols courts. Il serait envisageable de tester des peptaïbols produits par synthèse organique chez lesquels des variations structurales seraient produites comme par exemple :

- une modification des extrémités N-terminales et/ou C-terminales etc.
- un remplacement de certains acides aminés
- une augmentation/diminution de l'hydrophobie globale

Ceci permettrait d'en étudier les conséquences sur l'activité biologique et de mieux cerner les mécanismes d'actions des peptaïbols courts sur ce modèle.

## P3-V- Peptaïbols : conclusion et perspectives

L'objectif principal de ce travail était d'étudier la production de peptaïbols, métabolites susceptibles d'être impliqués dans des phénomènes de contamination de coquillages et de représenter ainsi un risque pour leurs consommateurs.

Pour cela, les peptaïbols ont été recherchés chez les deux souches de *Trichoderma* sp. isolées des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire à partir de cultures identiques à celles utilisées pour l'étude lipidique. L'utilisation d'un milieu riche ainsi que des méthodes séparatives issues de l'étude lipidique ont démontré tout leur intérêt en permettant d'obtenir des quantités importantes de peptaïbols jamais atteintes auparavant au Laboratoire.

La méthodologie employée a ainsi permis, chez les deux souches, d'étudier les deux grandes familles de peptaïbols à courtes et longues séquences. Un bilan des principaux résultats obtenus peut être dressé.

Concernant les peptaïbols courts, cette étude correspond au plus grand nombre de séquences homologues décrites à ce jour en une seule fois. Trente séquences dont 22 nouvelles ont été identifiées chez *T. longibrachiatum* faisant de cette espèce une souche de référence pour la production de peptaïbols à 11 résidus.

L'étude des peptaïbols courts fait ressortir l'intérêt d'utiliser ce type de métabolites pour la taxonomie des *Trichoderma*. En effet, la comparaison des profils de répartition des peptaïbols à 11 résidus a permis de montrer des caractéristiques propres aux deux souches. Une étude basée sur la même approche et réalisée sur un plus grand nombre de souches du genre *Trichoderma* pourrait permettre de réaliser des regroupements chimiotaxonomiques et d'apporter ainsi des compléments d'information sur la distinction des espèces.

L'étude des peptaïbols courts présente également un grand intérêt dans la compréhension des mécanismes de biosynthèse non ribosomale mis en jeu chez les *Trichoderma* sp. La mise en évidence de la présence de peptaïbols à 9 et 10 résidus qui correspondraient à des peptides chez lesquels une ou plusieurs erreurs seraient intervenues lors de la biosynthèse, renforce l'intérêt d'étudier les peptaïbols courts. Toutefois, les hypothèses mises en avant devront être confirmées en poursuivant d'une part, la purification de ces peptides particuliers et d'autre part, en réalisant une analyse de leur composition en acides aminés élémentaires.

L'étude pharmacologique des peptaïbols courts, a permis de mettre en évidence que cette famille ne présentait que peu d'intérêt en ce qui concerne leur potentiel toxigène lié à la présence des *Trichoderma* en milieu marin. Néanmoins, les tests d'action sur la viabilité cellulaire ont permis de mettre en avant que le modèle utilisé pourrait être intéressant, notamment dans la compréhension des mécanismes d'insertion membranaire des peptaïbols courts.

Contrairement aux peptaïbols courts, les peptaïbols longs semblent représenter un grand intérêt toxologique en tant que toxines potentiellement impliquées dans des phénomènes de contamination de coquillages. Compte tenu d'une part des toxicités observées pour les peptaïbols à 20 résidus sur larves de diptères et sur souris, et d'autre part par le fait que les mêmes groupes de peptaïbols ont été identifiés dans le milieu naturel, nous pouvons confirmer que ces peptides représentent un risque potentiel qui reste à

définir pour les coquillages et leurs consommateurs et une cause possible de positivité des tests de toxicité aiguë sur souris pour le contrôle de la salubrité des coquillages.

Enfin, au même titre que les peptaïbols à 11 résidus, les peptaïbols longs pourraient représenter un intérêt chimiotaxonomique à un niveau taxonomique plus large, celui des Ascomycètes producteurs de peptaïbols.

Conclusion générale

# Conclusion générale

---

L'étude des communautés fongiques des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire qui a porté sur un total de 54 échantillons prélevés tous les quatre mois sur des sites identiques a permis de montrer une influence de la saison avec une augmentation de la présence fongique en hiver. Cette étude a également montré une influence de l'environnement avec des résultats similaires en fonction des zones étudiées.

Il s'agit, à notre connaissance, de l'étude la plus importante en durée sur les communautés fongiques d'Ascomycètes saprotrophes en milieu marin. Les résultats ont montré la nette prédominance des *Penicillium* sp. suivie par les *Aspergillus* sp. et les *Trichoderma* sp. Ces champignons doivent trouver dans les sédiments des parcs conchylicoles les ressources nutritives nécessaires pour se développer du fait de la grande richesse de ces milieux en substances organiques, correspondant aux fèces et pseudofèces des coquillages.

Depuis la mise en évidence par le Laboratoire de métabolites fongiques dans le milieu naturel au niveau de sédiments et de coquillages du Fier d'Ars, il n'y a plus de doute sur le réel développement des moisissures saprotrophes dans ces milieux. La présente étude, en montrant la richesse des communautés fongiques et leur évolution au cours du temps, démontre la nécessité qu'il y aura dans l'avenir, de tenir compte de la microfonge pour comprendre le fonctionnement global des écosystèmes marins.

Une fois la richesse de la microfonge des zones conchylicoles mise en évidence, il était intéressant de se demander si elle ne pouvait pas intervenir dans la nutrition des organismes marins et pour aller plus loin, si les champignons isolés et conservés dans la Mycothèque du Laboratoire ne pouvaient pas être considérés comme de nouvelles sources de lipides originaux valorisables en nutrition et santé humaine.

Afin de répondre à cette question, quatre souches, deux *Penicillium* sp., correspondant au genre le plus abondant, et deux *Trichoderma* sp. ont été mis en culture et analysés afin d'évaluer leur production de lipides et d'acides gras.

L'analyse des acides gras a montré des compositions proches des souches terrestres avec notamment la présence majoritaire des acides linoléique, palmitique et oléique. Néanmoins, il a été révélé pour la première fois chez ces champignons la présence d'acides gras di et triinsaturés conjugués en proportion non négligeable en comparaison avec leurs autres sources naturelles connues.

Une souche, *P. citreonigrum*, s'est particulièrement distinguée en produisant une quantité importante de triglycérides et comprenant des séries d'acides gras conjugués sans précédents tel que l'acide 4-Me-6,8-16:2. Ce dernier a été isolé et purifié par complexation à l'urée et CLHP/Ag<sup>+</sup> afin d'évaluer ses propriétés biologiques et pharmacologiques. Cette étude a ainsi permis de mettre en évidence que les micromycètes isolés des zones conchylicoles, pouvaient représenter un réel intérêt biotechnologique et pharmacologique de par leur production d'acides gras et surtout d'acides gras conjugués.

Le dernier volet envisagé dans cette étude correspond au risque toxique engendré par la présence de certains champignons dans les zones conchylicoles. Cette étude faisait suite à un ensemble de travaux réalisés au Laboratoire depuis plusieurs années ayant permis de montrer récemment la présence de métabolites fongiques dans les sédiments et les coquillages.

Les peptaïbols, peptides linéaires typiques du monde fongique, peuvent être considérés comme biomarqueurs et comme toxines fongiques. La présente étude a permis d'aller plus loin dans la compréhension de leur biosynthèse par les peptides synthétases non ribosomales grâce à l'observation d'un très grand nombre de séquences microhétérogènes proches, composées de 11 acides aminés. Ces séquences sont d'ailleurs caractéristiques des champignons du genre *Trichoderma* et pourront, dans une future étude, constituer la base d'un classement chimiotaxonomique des champignons de ce genre.

De la même façon, mais sans doute à un degré moindre, l'étude des peptaïbols longs à 18 ou 20 résidus pourra servir à cette classification chimiotaxonomique. Néanmoins, ces derniers sont surtout intéressants pour leurs propriétés neurotoxiques qui ont été montrées sur larves de diptères et sur souris et qui peuvent justifier à elles seules la recherche de ces substances dans la chaîne alimentaire marine.

Il est possible de récapituler les avancées apportées par ce travail sous la forme d'un bilan en quelques items :

- la mise en Mycothèque de 400 souches fongiques marines
- l'approfondissement des connaissances sur les lipides et acides gras des micromycètes d'origine marine
- la mise en évidence de nombreux acides gras conjugués di et triinsaturés
- l'isolement et l'obtention à un haut degré de purification d'un nouvel acide gras ramifié et conjugué à intérêt nutritionnel et thérapeutique potentiel
- l'observation du plus grand nombre de séquences microhétérogènes de peptaïbols effectuée en une seule fois sur une même souche
- l'identification de 50 séquences peptidiques dont 33 nouvelles

Enfin, il ouvre, d'une manière plus générale, des voies d'études sur les lipides fongiques valorisables en nutrition par biotechnologies, sur la chimiotaxonomie du genre *Trichoderma*, genre particulièrement complexe et sur la mycotoxinologie marine.

## Références bibliographiques

# Références bibliographiques

---

**Abdel-Wahab, M.A., 2005**

Diversity of marine fungi from Egyptian Red Sea mangroves.  
Bot. Mar., 48, 348-355.

**Ackman, R.G., 1989**

Fatty Acids.  
Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils, vol. 1. Ackman, R.G. (Ed.)  
CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p. 462.

**Aki, T., Matsumoto, Y., Morinaga, T., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K. et Suzuki, O., 1998**

Lipid composition of a newly isolated polyunsaturated fatty acid- producing fungus, *Achlya* sp. ma-2801.  
J. Ferm. Bioeng., 86, 504-507.

**Aki, T., Nagahata, Y., Ishihara, K., Tanaka, Y., Morinaga, T., Higashiyama, K., Akimoto, K., Fujikawa, S., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K. et Suzuki, O., 2001**

Production of arachidonic acid by filamentous fungus, *Mortierella alliacea* strain YN-15.  
J. Am. Oil Chem. Soc., 78, 599-604.

**Ananda, K., Prasannarai, K. et Sridhar, K.R., 1998**

Occurrence of higher marine fungi on marine animal substrates of some beaches along the west coast of India.  
Indian J. Mar. Sci., 27, 233-236.

**Andersson, B.A., 1978**

Mass spectrometry of fatty acid pyrrolidides.  
Prog. Chem. Fats other Lipids, 16, 279-308.

**Arbonés-Mainar, J.M., Navarro, M.A., Guzmán, M.A., Arnal, C., Surra, J.C., Acín, S., Carnicer, R., Osada, J. et Roche, H.M., 2006**

Selective effect of conjugated linoleic acid isomers on atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E knockout mice.  
Atherosclerosis, 189, 318-327.

**Arts, M.T., Ackman, R.G. et Holub, B.J., 2001**

"Essential fatty acids" in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution.  
Can. J. Fish. Aquat. Sci., 58, 122-137.

**Arvanitidou, M., Kanellou, K., Katsouyannopoulos, V. et Tsakris, A., 2002**

Occurrence and densities of fungi from northern Greek coastal bathing waters and their relation with faecal pollution indicators.  
Water Res., 36, 5127-5131.

**Augeven-Bour, I., Rebuffat, S., Goulard, C., Prigent, Y. et Bodo, B., 1997**

Harzianin HB I, an 11-residue peptaibol from *Trichoderma harzianum*: isolation, sequence, solution synthesis and membrane activity.  
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1587-1594.

**Auvin-Guette, C., Rebuffat, S., Prigent, Y. et Bodo, B., 1992**

Trichogin A IV, an 11-Residue Lipopeptaibol from *Trichoderma longibrachiatum*.  
J. Am. Chem. Soc., 114, 2170-2174.

**Auvin-Guette, C., Rebuffat, S., Vuidepot, I., Massias, M. et Bodo, B., 1993**

Structural elucidation of trikoningins KA and KB, peptaibols from *Trichoderma koningii*.  
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 249-255.

**Bajpai, P., Bajpai, P.K. et Ward, O.P., 1991a**

Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum*.  
Appl. Microbiol. Biotech., 35, 706-710.

**Bajpai, P.K., Bajpai, P. et Ward, O.P., 1991b**

Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304.  
J. Am. Oil Chem. Soc., 68, 509-514.

**Bajpai, P.K., Bajpai, P. et Ward, O.P., 1991c**

Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* ATCC 32222.  
J. Ind. Microbiol., 8, 179-185.

**Ballance, P.R. et Crombie, W.M., 1961**

Synthesis of lipids from [2-<sup>14</sup>C]acetate and [<sup>14</sup>C]glucose by *Trichoderma viride*.  
Biochem. J., 80, 170-175.

**Barghoorn, E.S. et Linder, D.H., 1944**

Marine fungi, their taxonomy and biology.  
Farlowia, 1, 395-467.

**Barnathan, G., Doumenq, P., Njinkoué, J.M., Mirallès, J., Debitus, C., Levi, C. et Kornprobst, J.M., 1994**

Sponge fatty acids. 3. Occurrence of series of n-7 monoenoic and iso-5,9 dienoic long-chain fatty acids in the phospholipids of the marine sponge *Cinachyrella* aff. *schulzei* Keller.  
Lipids, 29, 297-303.

**Barnathan, G., Kornprobst, J.M., Doumenq, P., Mirallès, J. et Boury-Esnault, N., 1993**

Sponge fatty acids, 5. Characterization of complete series of 2-hydroxy long-chain fatty acids in phospholipids of two Senegalese marine sponges from the family Suberitidae: *Pseudosuberites* sp. and *Suberites massa*.  
J. Nat. Prod., 56, 2104-2113.

**Barnathan, G., Mirallès, J., Gaydou, E.M., Boury-Esnault, N. et Kornprobst, J.M., 1992**

New phospholipid fatty acids from the marine sponge *Cinachyrella alloclada* Uliczka.  
Lipids, 27, 779-784.

**Batrkov, S.G., Konova, I.V., Sheichenko, V.I., Esipov, S.E. et Galanina, L.A., 2001**

Two unusual glycerophospholipids from a filamentous fungus, *Absidia corymbifera*.  
Biochim. Biophys. Acta, 1531, 169-177.

**Batrkov, S.G., Konova, I.V., Sheichenko, V.I., Esipov, S.E., Galanina, L.A. et Istratova, L.N., 2002**

Unusual fatty acid composition of cerebrosides from the filamentous soil fungus *Mortierella alpina*.  
Chem. Phys. Lipids, 117, 45-51.

**Batrkov, S.G., Konova, I.V., Sheichenko, V.I., Esipov, S.E., Galanina, L.A., Istratova, L.N. et Sergeeva, Y.E., 2004**

Lipids of the zygomycete *Absidia corymbifera* F-965.  
Phytochemistry, 65, 1239-1246.

**Batrkov, S.G., Konova, I.V., Sheichenko, V.I. et Galanina, L.A., 2003**

Glycolipids of the filamentous fungus *Absidia corymbifera* F-295.  
Chem. Phys. Lipids, 123, 157-164.

**Bauch, R., 1936**

*Ophiobolus kniepii*, ein neuer parasitischer Pyrenomycet auf Kalkalgen.  
Publ. Staz. Zool. Napoli, 15, 377-391.

**Baumann, G. et Mueller, P., 1974**

A molecular model of membrane excitability.  
J. Supramol. Struct., 2, 538-557.

**Becker, D., Kiess, M. et Brückner, H., 1997**

Structure of peptaibol antibiotics hypomurocin A and B from the ascomycetous fungus *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto.  
Liebigs Ann. Recueil, 767-772.

**Belitz, H.D. et Grosch, W., 1987**

Food Chemistry.  
Springer-Verlag, Berlin. 774 p.

**Benedetti, E., Bavoso, A., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., Toniolo, C. et Bonora, G.M., 1982**

Peptaibol antibiotics: a study on the helical structure of the 2-9 sequence of emerimicins III and IV.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79, 7951-7954.

**Bengen, M.F., 1940**

German Patent Appl. OZ 123438.

- Berg, A., Grigoriev, P.A., Degenkolb, T., Neuhof, T., Härtl, A., Schlegel, B. et Gräfe, U., 2003**  
Isolation, structure elucidation and biological activities of trichofumins A, B, C and D, new 11 and 13mer peptaibols from *Trichoderma* sp. HKI 0276.  
J. Pept. Sci., 9, 810-816.
- Berg, A., Schlegel, B., Ihn, W., Demuth, U. et Gräfe, U., 1999**  
Isolation and structural elucidation of new peptaibols, bergofungins B, C and D, from *Emericellopsis donezkii* HKI 0059.  
J. Antibiot., 52, 666-669.
- Bergé, J.P. et Barnathan, G., 2005**  
Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, role as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspect.  
Adv. Biochem. Engin. Biotechnol., 96, 49-125.
- Béven, L., Duval, D., Rebuffat, S., Riddell, F.G., Bodo, B. et Wróblewski, H., 1998**  
Membrane permeabilisation and antimycoplasmic activity of the 18-residue peptaibols, trichorzins PA.  
Biochim. Biophys. Acta, 1372, 78-90.
- Béven, L., Helluin, O., Molle, G., Duclohier, H. et Wróblewski, H., 1999**  
Correlation between anti-bacterial activity and pore sizes of two classes of voltage-dependent channel-forming peptides.  
Biochim. Biophys. Acta, 1421, 53-63.
- Béven, L. et Wróblewski, H., 1997**  
Effect of natural amphiphatic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes.  
Res. Microbiol., 148, 163-175.
- Bhadury, P., Mohammad, B.T. et Wright, P.C., 2006**  
The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents.  
J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 33, 325-337.
- Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J. et Fernandes, G., 2006**  
Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease.  
J. Nutr. Biochem., 17, 789-810.
- Biemann, K., 1988**  
Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure.  
Biomed. Environ. Mass Spectrom., 16, 99-111.
- Billich, A. et Zocher, R., 1987**  
Enzymatic synthesis of cyclosporin A.  
J. Biol. Chem., 262, 17258-17259.
- Birch, D.G., Birch, E.E., Hoffman, D.R. et Uauy, R.D., 1992a**  
Retinal development in very-low-birth-weight infants fed diets differing in omega-3 fatty acids.  
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 33, 2365-2376.
- Birch, E.E., Birch, D.G., Hoffman, D.R. et Uauy, R., 1992b**  
Dietary essential fatty acid supply and visual acuity development.  
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 33, 3242-3253.
- Bissett, J., 1984**  
A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum*.  
Can. J. Bot., 62, 924-931.
- Bissett, J., 1991a**  
A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification.  
Can. J. Bot., 69, 2357-2372.
- Bissett, J., 1991b**  
A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*.  
Can. J. Bot., 69, 2373-2417.
- Bissett, J., 1991c**  
A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *longibrachiatum*.  
Can. J. Bot., 69, 2417-2420.

**Black, H.S. et Rhodes, L.E., 2006**

The potential of omega-3 fatty acids in the prevention of non-melanoma skin cancer.  
Cancer Detec. Prevent., 30, 224-232.

**Bligh, E.G. et Dyer, W.J., 1959**

A rapid method of total lipid extraction and purification.  
Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917.

**Block, J.H., Catalfomo, P. et Constantine, G.H., Jr., 1973**

Triglyceride fatty acids of selected higher marine fungi.  
Mycologia, 65, 488-491.

**Blondeau, N. et Schneider, S.M., 2006**

Les acides gras essentiels de la famille des oméga-3 et la santé de la mère et de l'enfant - Omega-3 fatty acids for mother and child health.  
Nutr. Clin. Métab., 20, 68-72.

**Bobbitt, J.M., Schwarting, A.E. et Gritter, R.J., 1972**

Introduction à la Chromatographie.  
Gauthier-Villars, Paris. 189 p.

**Boheim, G., Hanke, W. et Jung, G., 1983**

Alamethicin pore formation: Voltage-dependent flip-flop of  $\alpha$ -helix dipoles.  
Eur. Biophys J., 9, 181-191.

**Bonzom, P.M., Nicolaou, A., Zloh, M., Baldeo, W. et Gibbons, W.A., 1999**

NMR lipid profile of *Agaricus bisporus*.  
Phytochemistry, 50, 1311-1321.

**Borenfreund, E. et Puerner, J.A., 1985**

Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption.  
Toxicol. Lett., 24, 119-124.

**Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y. et Veau, P., 1990**

Moisissures Utiles et Nuisibles : Importance Industrielle.  
Masson, Paris. 512 p.

**Bouchet, P., Guignard, J.L., Pouchus, Y.F. et Villard, J., 2005**

Les champignons : Mycologie Fondamentale et Appliquée.  
Masson, Paris. 191 p.

**Bowles, R.D., Hunt, A.E., Bremer, G.B., Duchars, M.G. et Eaton, R.A., 1999**

Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the Thraustochytrids: Screening of isolates and optimisation of docosahexaenoic acid production.  
J. Biotechnol., 70, 193-202.

**Bowman, R.D. et Mumma, R.O., 1967**

The lipids of *Pythium ultimum*.  
Biochim. Biophys. Acta, 144, 501-510.

**Brennan, P.J., Griffin, P.F.S., Losel, D.M. et Tyrrell, D., 1975**

The lipids of fungi.  
Prog. Chem. Fats other Lipids, 14, 49-89.

**Brennan, P.J. et Roe, J., 1975**

The occurrence of a phosphorylated glycosphingolipid in *Aspergillus niger*.  
Biochem. J., 147, 179-180.

**Brites, P., Waterham, H.R. et Wanders, R.J.A., 2004**

Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease.  
Biochim. Biophys. Acta, 1636, 219-231.

**Brogden, K.A., 2005**

Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?  
Nat. Rev. Microbiol., 3, 238-250.

- Brown, D.E., Hasan, M., Lepe-Casillas, M. et Thornton, A.J., 1990**  
Effect of temperature and pH on lipid accumulation by *Trichoderma reesei*.  
Appl. Microbiol. Biotech., 34, 335-339.
- Brückner, H. et Graf, H., 1983**  
Paracelsin, a peptide antibiotic containing  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, isolated from *Trichoderma reesei* Simmons.  
Part A.  
Experientia, 39, 528-530.
- Brückner, H., Graf, H. et Bokel, M., 1984**  
Paracelsin: characterization by NMR spectroscopy and circular dichroism, and hemolytic properties of a peptaibol antibiotic from the cellulolytically active mold *Trichoderma reesei*. Part B.  
Experientia, 40, 1189-1197.
- Brückner, H., König, W.A., Aydin, M. et Jung, G., 1985**  
Trichotoxin A40. Purification by counter-current distribution and sequencing of isolated fragments.  
Biochim. Biophys. Acta, 827, 51-62.
- Brückner, H., Kripp, T. et Kieb, M., 1991**  
Sequencing of new Aib-peptides by tandem mass spectrometry and automated Edman degradation.  
Peptides 1990, Proceedings of the 21<sup>th</sup> European Peptide Symposium, Giralt, E., Andreu, D. (Eds.).  
ESCOM Sciences Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 347-350.
- Brückner, H. et Przybylski, M., 1984a**  
Isolation and structural characterization of polypeptide antibiotics of the peptaibol class by high-performance liquid chromatography with field desorption and fast atom bombardment mass spectrometry.  
J. Chromatogr. A., 296, 263-275.
- Brückner, H. et Przybylski, M., 1984b**  
Methods for the rapid detection, isolation and sequence determination of peptaibols and other Aib-containing peptides of fungal origin. I. Gliodeliquescin A from *Gliocladium deliquescens*.  
Chromatographia, 19, 188-199.
- Buchalo, A.S., Nevo, E., Wasser, S.P., Oren, A. et Molitoris, H.P., 1998**  
Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea: First records.  
Proc. R. Soc. Lon. Ser. B Biol. Sci., 265, 1461-1465.
- Burja, A.M., Radianingtyas, H., Windust, A. et Barrow, C.J., 2006**  
Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production.  
Appl. Microbiol. Biotech., 72, 1161-1169.
- Butinar, L., Sonjak, S., Zalar, P., Plemenitas, A. et Gunde-Cimerman, N., 2005**  
Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns.  
Bot. Mar., 48, 73-79.
- Byrne, P.F.S. et Brennan, P.J., 1976**  
Isolation and characterization of Inositol-containing Glycosphingolipids from *Aspergillus niger*.  
Biochem. Soc. Trans., 4, 893-895.
- Cafiso, D.S., 1994**  
Alamethicin: a peptide model for voltage gating and protein-membrane interactions.  
Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 23, 141-165.
- Carballeira, N.M., Cruz, C. et Sostre, A., 1996**  
Identification of the novel 7-methyl-6-octadecenoic acid in *Holothuria mexicana*.  
J. Nat. Prod., 59, 1076-1078.
- Carballeira, N.M., Cruz, H., Hill, C.A., De Voss, J.J. et Garson, M., 2001**  
Identification and total synthesis of novel fatty acids from the siphonariid limpet *Siphonaria denticulata*.  
J. Nat. Prod., 64, 1426-1429.
- Carballeira, N.M., Emiliano, A., Rodriguez, J. et Reyes, E.D., 1992**  
Isolation and characterization of novel 2-hydroxy fatty acids from the phospholipids of the sponge *Smenospongia aurea*.  
Lipids, 27, 681-685.

**Carballeira, N.M. et Rodriguez, J., 1991**

Two novel phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge *Geodia gibberosa*.  
Lipids, 26, 324-326.

**Carballeira, N.M. et Shalabi, F., 1994**

Unusual lipids in the Caribbean sponges *Amphimedon viridis* and *Desmapsamma anchorata*.  
J. Nat. Prod., 57, 1152-1159.

**Certík, M., Sláviková, L., Masrnová, S. et Šajbidor, J., 2006**

Enhancement of nutritional value of cereals with  $\gamma$ -linolenic acid by fungal solid-state fermentations.  
Food Technol. Biotechnol., 44, 75-82.

**Cheng, M.H., Walker, T.H., Hulbert, G.J. et Raman, D.R., 1999**

Fungal production of eicosapentaenoic and arachidonic acids from industrial waste streams and crude soybean oil.  
Bioresour. Technol., 67, 101-110.

**Chobot, V., Opletal, L., Jahodar, L., Patel, A.V., Dacke, C.G. et Blunden, G., 1997**

Ergosta-4,6,8,22-tetraen-3-one from the edible fungus, *Pleurotus ostreatus* (oyster fungus).  
Phytochemistry, 45, 1669-1671.

**Choudhury, S.R., Traquair, J.A. et Jarvis, W.R., 1994**

4-Methyl-7,11-heptadecadienal and 4-methyl-7,11-heptadecadienoic acid: New antibiotics from *Sporothrix flocculosa* and *Sporothrix rugulosa*.  
J. Nat. Prod., 57, 700-704.

**Christiansen, K., 1978**

Triacylglycerol synthesis in lipid particles from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).  
Biochim. Biophys. Acta, 530, 78-90.

**Christie, W.W., 1988**

Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography - A reappraisal.  
J. Chromatogr. A., 447, 305-314.

**Christie, W.W., 1997**

Structural analysis of fatty acids.  
Advances in Lipid Methodology, vol. 4. Christie, W.W. (Ed.)  
The Oily Press, Dundee (Scotland), pp. 119-169.

**Christophersen, C., Crescente, O., Frisvad, J.C., Gram, L., Nielsen, J., Halfdan Nielsen, P. et Rahbaek, L., 1999**

Antibacterial activity of marine-derived fungi.  
Mycopathologia, 143, 135-138.

**Chugh, J.K. et Wallace, B.A., 2001**

Peptaibols: Models for ion channels.  
Biochem. Soc. Trans., 29, 565-570.

**Conti, E., Stredansky, M., Stredanska, S. et Zanetti, F., 2001**

$\gamma$ -Linolenic acid production by solid-state fermentation of Mucorales strains on cereals.  
Bioresour. Technol., 76, 283-286.

**Cooney, J.J., Doolittle, M.M., Grahl-Nielsen, O., Haaland, M. et Kirk, P.W., 1993**

Comparison of fatty acids of marine fungi using multivariate statistical analysis.  
J. Ind. Microbiol., 12, 373-378.

**Cox, K.D., Scherm, H. et Riley, M.B., 2006**

Characterization of *Armillaria* spp. from peach orchards in the southeastern United States using fatty acid methyl ester profiling.  
Mycol. Res., 110, 414-422.

**da Silva, M., Umbuzeiro, G.A., Pfenning, L.H., Canhos, V.P. et Esposito, E., 2003**

Filamentous fungi isolated from estuarine sediments contaminated with industrial discharges.  
Soil. Sed. Contam., 12, 345-356.

**Dallakian, P. et Budzikiewicz, H., 1997**

Gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry in amino acid analysis of pyoverdins.  
J. Chromatogr. A., 787, 195-203.

**Dart, R.K., Stretton, R.J. et Lee, J.D., 1976**

Relationships of *Penicillium* species based on their long-chain fatty acids.  
Trans. Br. Mycol. Soc., 66, 525-529.

**de Moura Sarquis, M.I. et de Oliveira, P.C., 1996**

Diversity of microfungi in the sandy soil of Ipanema Beach, Rio de Janeiro, Brazil.  
J. Basic. Microbiol., 36, 51-58.

**Degenkolb, T., Berg, A., Gams, W., Schlegel, B. et Gräfe, U., 2003**

The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions.  
J. Pept. Sci., 9, 666-678.

**Degenkolb, T., Gräfenham, T., Berg, A., Nirenberg, H.I., Gams, W. et Brückner, H., 2006a**

Peptaibiomics: Screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species.  
Chem. Biodivers., 3, 593-610.

**Degenkolb, T., Gräfenham, T., Nirenberg, H.I., Gams, W. et Brückner, H., 2006b**

*Trichoderma brevicompactum* complex: rich source of novel and recurrent plant-protective polypeptide antibiotics (peptaibiotics).  
J. Agric. Food. Chem., 54, 7047-7061.

**del Carmen Gonzalez, M., Herrera, T., Ulloa, M. et Hanlin, R.T., 1998**

Abundance and diversity of microfungi in three coastal beaches of Mexico.  
Mycosciences, 39, 115-121.

**Del Frate, G. et Caretta, G., 1990**

Fungi isolated from Antarctic material.  
Polar Biol., 11, 1-7.

**Denizot, F. et Lang, R., 1986**

Rapid colorimetric assay for cell growth and survival - Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.  
J. Immunol. Methods, 89, 271-277.

**Di Blasio, B., Pavone, V., Saviano, M., Lombardi, A., Nastri, F., Benedetti, E., Crisma, M., Anzolin, M. et Toniolo, C., 1992**

Structural characterization of the  $\beta$ -bend ribbon spiral: crystallographic analysis of two long (L-Pro-Aib)<sub>n</sub> sequential peptides.  
J. Am. Chem. Soc., 114, 6273-6278.

**Dimou, D.M., Georgala, A., Komaitis, M. et Aggelis, G., 2002**

Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation.  
Mycol. Res., 106, 925-929.

**Djoussé, L., Folsom, A.R., Province, M.A., Hunt, S.C. et Ellison, R.C., 2003a**

Dietary linolenic acid and carotid atherosclerosis: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study.  
Am. J. Clin. Nutr., 77, 819-825.

**Djoussé, L., Hunt, S.C., Arnett, D.K., Province, M.A., Eckfeldt, J.H. et Ellison, R.C., 2003b**

Dietary linolenic acid is inversely associated with plasma triacylglycerol: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study.  
Am. J. Clin. Nutr., 78, 1098-1102.

**Duarte, R.S., Polycarpo, C.R., Wait, R., Hartmann, R. et Barreto Bergter, E., 1998**

Structural characterization of neutral glycosphingolipids from *Fusarium* species.  
Biochim. Biophys. Acta, 1390, 186-196.

**El Hajji, M., Rebuffat, S., Le Doan, T., Klein, G., Satre, M. et Bodo, B., 1989**

Interaction of trichorzianines A and B with model membranes and with the amoeba *Dictyostelium*.  
Biochim. Biophys. Acta, 978, 97-104.

**Ellenbogen, B.B., Aaronson, S., Goldstein, S. et Belsky, M., 1969**

Polyunsaturated fatty acids of aquatic fungi: possible phylogenetic significance. *Comp. Biochem. Physiol.*, 29, 805-811.

**El-Sharouny, H.M., Raheem, A.M. et Abdel-Wahab, M.A., 1998**

Manglicolous fungi of the Red sea in Upper Egypt. *Microbiol. Res.*, 153, 81-96.

**Emelyanova, E.V., 1996**

$\gamma$ -linolenic acid production by *Cunninghamella japonica* in solid state fermentation. *Process Biochem.*, 31, 431-434.

**Emelyanova, E.V., 1997**

Lipid and  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mucor inaequisporus*. *Process Biochem.*, 32, 173-177.

**Engelmann, B., 2004**

Plasmalogens: targets for oxidants and major lipophilic antioxidants. *Biochem. Soc. Trans.*, 32, 147-150.

**Epand, R.M., Shai, Y., Segrest, J.P. et Anantharamaiah, G.M., 1995**

Mechanisms for the modulation of membrane bilayer properties by amphipathic helical peptides. *Biopolymers*, 37, 319-338.

**Favilla, M., Macchia, L., Gallo, A. et Altomare, C., 2006**

Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food Chem. Tox.*, 44, 1922-1931.

**Fenical, W. et Jensen, P.R., 1997**

Marine fungi: a developing focus in marine natural products chemistry. *First Euroconference on Marine Natural Products*, Athens, vol. 13.

**Folch, J., Lees, M. et Sloane Stanley, G.H., 1957**

A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.

**Fox, R.O. et Richards, F.M., 1982**

A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-Å resolution. *Nature*, 300, 325-330.

**Frankel, E.N., Neff, W.E. et Selke, E., 1984**

Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry. IX. Homolytic vs. heterolytic cleavage of primary and secondary oxidation products. *Lipids*, 19, 790-800.

**Fuji, K., Fujita, E., Takaishi, Y., Fujita, T., Arita, I., Komatsu, M. et Hirastuka, N., 1978**

New antibiotics, trichopolyns A and B: isolation and biological activity. *Experientia*, 34, 237-239.

**Fujita, T., Takaishi, Y. et Moritoki, H., 1984**

Fungal metabolites. I. Isolation and biological activities of hypelcins A and B (growth inhibitors against *Lentinus edodes*) from *Hypocrea peltata*. *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 1822-1828.

**Fujita, T., Wada, S.I., Iida, A., Nishimura, T., Kanai, M. et Toyama, N., 1994**

Fungal metabolites. XIII. Isolation and structural elucidation of new peptaibols, trichodecenins-I and -II from *Trichoderma viride*. *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 489-494.

**Gandhi, S.R. et Weete, J.D., 1991**

Production of the polyunsaturated fatty acids arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by the fungus *Pythium ultimum*. *J. Gen. Microbiol.*, 137, 1825-1830.

**Gao, J.M., Yang, X., Wang, C.Y. et Liu, J.K., 2001**

Armillaramide, a new sphingolipid from the fungus *Armillaria mellea*.  
Fitoterapia, 72, 858-864.

**Gema, H., Kavadia, A., Dimou, D., Tzagou, V., Komaitis, M. et Aggelis, G., 2002**

Production of  $\gamma$ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel.  
Appl. Microbiol. Biotech., 58, 303-307.

**Genilloud, O., Pelaez, F., Gonzalez, I. et Diez, M.T., 1994**

Diversity of actinomycetes and fungi on seaweeds from the Iberian coasts.  
Microbiologia, 10, 413-422.

**Gold, H.S., 1959**

Distribution of some lignicolous Ascomycetes and Fungi Imperfecti in an estuary.  
J Elisha Mitchell Sci. Soc., 75, 25-28.

**Goldfine, H. et Panos, C., 1971**

Phospholipids of *Clostridium butyricum*. IV. Analysis of the positional isomers of monounsaturated and cyclopropane fatty acids and alk-1'-enyl ethers by capillary column chromatography.  
J. Lipid Res., 12, 214-220.

**González, M.C., Hanlin, R.T., Herrera, T. et Ulloa, M., 1998**

Abundance and diversity of microfungi in three coastal beaches of Mexico.  
Mycosciences, 39, 115-121.

**González, M.C., Hanlin, R.T., Herrera, T. et Ulloa, M., 2000**

Fungi colonizing hair-baits from three coastal beaches of Mexico.  
Mycosciences, 41, 259-262.

**Goulard, C., Hlimi, S., Rebuffat, S. et Bodo, B., 1995**

Trichorzins HA and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum* I. Fermentation, isolation and biological properties.  
J. Antibiot., 48, 1248-1253.

**Gräfe, U., Ihn, W., Ritzau, M., Schade, W., Stengel, C., Schlegel, B., Fleck, W.F., Künkel, W., Härtl, A. et Gutsche, W., 1995**

Helioferins: Novel antifungal lipopeptides from *Mycogone rosea*: Screening, isolation, structures and biological properties.  
J. Antibiot., 48, 126-133.

**Grandmougin-Ferjani, A., Dalpe, Y., Hartmann, M.A., Laruelle, F. et Sancholle, M., 1999**

Sterol distribution in arbuscular mycorrhizal fungi.  
Phytochemistry, 50, 1027-1031.

**Grasso, S., Bruni, V. et Maio, G., 1997**

Marine fungi in Terra Nova bay (Ross sea, Antartica).  
Microbiologica, 20, 371-376.

**Gray, W.D., Pinto, P.V.C. et Pathak, S.G., 1963**

Growth of fungi in sea water medium.  
Appl. Microbiol., 11, 501-505.

**Griffiths, K.M., Bacic, A. et Howlett, B.J., 2003a**

Sterol composition of mycelia of the plant pathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*.  
Phytochemistry, 62, 147-153.

**Griffiths, R.G., Dancer, J., O'Neill, E. et Harwood, J.L., 2003b**

Effect of culture conditions on the lipid composition of *Phytophthora infestans*.  
New Phytol., 158, 337-344.

**Grigoriev, P., Berg, A., Schlegel, R. et Gräfe, U., 1996**

Protonophoric activities of helioferin and pamamycin, lipophilic tertiary amine antibiotics from *Mycogone rosea* and *Streptomyces aurantiacus*.  
Bioelectrochem. Bioenerget., 39, 295-298.

**Grovel, O., 2002**

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.  
Thèse de doctorat, Université de Nantes, 272 p.

**Gunde-Cimerman, N., Sonjak, S. et Zalar, P., 2001**

Biodiversity of filamentous fungi in the saltpans Secovlje.  
Acta Biol. Slov., 48, 73-79.

**Gunde-Cimerman, N., Sonjak, S., Zalar, P., Frisvad, J.C., Diderichsen, B. et Plemenitas, A., 2003**

Extremophilic fungi in arctic ice: A relationship between adaptation to low temperature and water activity.  
Phys. Chem. Earth, 28, 1273-1278.

**Gurr, M.I., Blades, J. et Appleby, R.S., 1974**

Studies on seed oil triglycerides. Triglyceride biosynthesis and storage in whole seeds and oil bodies of *Crambe abyssinica*.  
Eur. J. Biochem., 43, 281-290.

**Hagen, P.O., 1974**

Lipids of *Sphaerophorus ridiculosus*: plasmalogen composition.  
J. Bacteriol., 119, 643-645.

**Hazell, S.L. et Graham, D.Y., 1990**

Unsaturated fatty acids and viability of *Helicobacter (Campylobacter) pylori*.  
J. Clin. Microbiol., 28, 1060-1061.

**He, H., Janso, J.E., Yang, H.Y., Bernan, V.S., Lin, S.L. et Yu, K., 2006**

Culicinin D, an antitumor peptaibol produced by the fungus *Culicinomyces clavissporus*, strain LL-121252.  
J. Nat. Prod., 69, 736-741.

**Henderson, R.J., 1999**

The production of n-3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms.  
Lipid Technol., 5-10.

**Hidajat, K., Ching, C.B. et Rao, M.S., 1995**

Preparative-scale liquid chromatographic separation of  $\omega$ -3 fatty acids from fish oil sources.  
J. Chromatogr. A., 702, 215-221.

**Hirovani, M., Hirovani, S. et Yoshikawa, T., 2000**

Blazeispirol X and Y, two novel carbon skeletal sterols from the cultured mycelia of the fungus *Agaricus blazei*.  
Tetrahedron Lett., 41, 5107-5110.

**Hornung, E., Krueger, C., Pernstich, C., Gipmans, M., Porzel, A. et Feussner, I., 2005**

Production of (10*E*,12*Z*)-conjugated linoleic acid in yeast and tobacco seeds.  
Biochim. Biophys. Acta, 1738, 105-114.

**Huang, Q., Tezuka, Y., Hatanaka, Y., Kikuchi, T., Nishi, A. et Tubaki, K., 1995**

Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. IV. Minor peptaibols of *Trichoderma koningii*.  
Chem. Pharm. Bull., 43, 1663-1667.

**Hughes, G.C., 1992**

Fifth International Marine Mycology Symposium, Vancouver, British Columbia (Canada). Introduction.  
Can. J. Bot., 70, 2079-2080.

**Hyde, K.D., Jones, E.B.G., Leano, E., Pointing, S.B., Poonyth, A.D. et Vrijmoed, L.L.P., 1998**

Role of fungi in marine ecosystems.  
Biod. Conserv., 7, 1147-1161.

**Iida, A., Mihara, T., Fujita, T. et Takaishi, Y., 1999**

Peptidic immunosuppressants from the fungus *Trichoderma polysporum*.  
Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 3393-3396.

**Iida, A., Okuda, M., Uesato, S., Takaishi, Y., Shingu, T., Morita, M. et Fujita, T., 1990**

Fungal metabolites. Part III. Structural elucidation of antibiotic peptides, Trichosporin-B-IIIb, -IVb, -IVc, -IVd, -VIa and -VIb from *Trichoderma polysporum*. Application of fast-atom bombardment mass spectrometry/mass spectrometry to peptides containing a unique Aib-Pro peptide bond.  
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 3249-3255.

**Iida, A., Sanekata, M., Fujita, T., Tanaka, H., Enoki, A., Fuse, G., Kanai, M., Rudewicz, P.J. et Tachikawa, E., 1994**

Fungal metabolites. XVI. Structures of new peptaibols, trichokindins I- VII, from the fungus *Trichoderma harzianum*.  
Chem. Pharm. Bull., 42, 1070-1075.

**Iida, A., Sanekata, M., Wada, S., Fujita, T., Tanaka, H., Enoki, A., Fuse, G., Kanai, M. et Asami, K., 1995**  
Fungal metabolites. XVIII. New membrane-modifying peptides, trichorozins I-IV, from the fungus *Trichoderma harzianum*.

Chem. Pharm. Bull., 43, 392-397.

**Iida, A., Uesato, S., Shingu, T., Okuda, M., Nagaoka, Y., Kuroda, Y. et Fujita, T., 1993**

Fungal metabolites. VI. Nuclear magnetic resonance study of antibiotic peptides, Trichosporin B, from *Trichoderma polysporum*.  
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 367-373.

**Iida, I., Nakahara, T., Yokochi, T., Kamisaka, Y., Yagi, H., Yamaoka, M. et Suzuki, O., 1996**

Improvement of docosahexaenoic acid production in a culture of *Thraustochytrium aureum* by medium optimization.  
J. Ferm. Bioeng., 81, 76-78.

**Irmscher, G. et Jung, G., 1977**

The hemolytic properties of the membrane modifying peptide antibiotics alamethicin, suzukacillin and trichotoxin.  
Eur. J. Biochem., 80, 165-174.

**Iverson, J.L. et Weik, R.W., 1967**

Correlation of fatty acid structure with preferential order of urea complex formation.  
J. Ass. Off. Anal. Chem., 50, 1111-1118.

**Jang, H.D., Lin, Y.Y. et Yang, S.S., 2005**

Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*.  
Bioresour. Technol., 96, 1633-1644.

**Jaworski, A. et Brückner, H., 2001**

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

**Jaworski, A., Kirschbaum, J. et Brückner, H., 1999**

Structures of trichovirins II, peptaibol antibiotics from the mold *Trichoderma viride* NRRL 5243.  
J. Pept. Sci., 5, 341-351.

**Johnson, D., Weber, D.J. et Hess, W.M., 1976**

Lipids from conidia of *Erysiphe graminis tritici* (powdery mildew).  
Trans. Br. Mycol. Soc., 66, 35-43.

**Jones, E.B.G., 1988**

Do fungi occur in the sea?  
Mycologist, 2, 150-157.

**Jones, E.B.G., 1998**

Des champignons dans l'océan !  
Biofutur, 179, 18-20.

**Juanéda, P. et Sébédo, J.L., 1999**

Combined silver-ion and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the separation and identification of C<sub>20</sub> metabolites of conjugated linoleic acid isomers in rat liver lipids.  
J. Chromatogr. B., 724, 213-219.

**Juanéda, P., Sébédo, J.L. et Christie, W.W., 1994**

Complete separation of the geometrical isomers of linolenic acid by high performance liquid chromatography with a silver ion column.  
J. High Resol. Chromatogr., 17, 321-324.

**Judd, J.T., Clevidence, B.A., Muesing, R.A., Wittes, J., Sunkin, M.E. et Podczasy, J.J., 1994**

Dietary trans fatty acids: effects on plasma lipids and lipoproteins of healthy men and women.  
Am. J. Clinical. Nutr., 59, 861-868.

**Kabara, J.J., Swieczkowski, D.M., Conley, A.J. et Truant, J.P., 1972**

Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents.  
Antimicrob. Agents Chemother., 2, 23-28.

**Karle, I.L., Flippen-Anderson, J., Sukumar, M. et Balaram, P., 1987**

Conformation of a 16-residue zervamicin IIA analog peptide containing three different structural features:  $3_{10}$ -helix,  $\alpha$ -helix, and  $\beta$ -bend ribbon.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 5087-5091.

**Kates, M., 1986**

Techniques of Lipidology - Isolation, Analysis and Identification of Lipids. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.  
Burdon, R.H. & van Knippenberg, P.H. (Eds.) Vol. 3, Part 2, Elsevier, Amsterdam. 464 p.

**Kendrick, A. et Ratledge, C., 1992**

Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids.  
Lipids, 27, 15-20.

**Keusgen, M., Yu, C.M., Curtis, J.M., Brewer, D. et Ayer, S.W., 1996**

A cerebroside from the marine fungus *Microsphaeropsis olivacea* (Bonord.) Hohn.  
Biochem. Syst. Ecol., 24, 465-468.

**Khan, A.G. et Belik, M., 1995**

Occurrence and Ecological Significance of Mycorrhizal Symbiosis in Aquatic Plants.  
Mycorrhiza - Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology, Varma, A., Hock, B. (Eds.).  
Springer-Verlag, Berlin, pp. 627 - 666.

**Khudyakova, Y.V., Pivkin, M.V., Kuznetsova, T.A. et Svetashev, V.I., 2000**

Fungi in sediment of the Sea of Japan and their biologically active metabolites.  
Microbiology, 69, 722-726.

**Khuller, G.K. et Goldfine, H., 1974**

Phospholipids of *Clostridium butyricum*. V. Effects of growth temperature on fatty acid, alk-1-enyl ether group, and phospholipid composition.  
J. Lipid Res., 15, 500-507.

**Kim, Y.H., Yeo, W.H., Kim, Y.S., Chae, S.Y. et Kim, K.S., 2000**

Antiviral activity of antibiotic peptaibols, chrysospermins B and D, produced by *Apiocrea* sp. 14T against TMV infection.  
J. Microbiol. Biotechnol., 10, 522-528.

**Kirschbaum, J., Krause, C., Winzheimer, R.K. et Brückner, H., 2003**

Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled.  
J. Pept. Sci., 9, 799-809.

**Kis-Papo, T., Grishkan, I., Oren, A., Wasser, S.P. et Nevo, E., 2001**

Spatiotemporal diversity of filamentous fungi in the hypersaline Dead Sea.  
Mycol. Res., 105, 749-756.

**Kis-Papo, T., Oren, A., Wasser, S.P. et Nevo, E., 2003**

Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water.  
Microb. Ecol., 45, 183-190.

**Knapp, H.R. et Melly, M.A., 1986**

Bactericidal effects of polyunsaturated fatty acids.  
J. Infect. Dis., 154, 84-94.

**Kohlmeyer, J., 1963**

The Importance of Fungi in the Sea.  
Symposium of Marine Microbiology, Oppenheimer, C.H. (Ed.)  
Charles C. Thomas Publ., Springfield, Il (USA), pp. 300-313.

**Kohlmeyer, J., Bebout, B. et Volkmann-Kohlmeyer, B., 1995**

Decomposition of mangrove wood by marine fungi and teredinids in Belize.  
Mar. Ecol., 16, 27-39.

**Kohlmeyer, J. et Kohlmeyer, E., 1979**

Marine Mycology: The Higher Fungi.  
Academic Press, New York, NY (USA). 690 p.

**Konova, I.V., Galanina, L.A., Kochkina, G.A. et Pan'kina, O.I., 2002**

Fatty acids in the species of several zygomycete taxa.  
Microbiology, 71, 550-557.

**Kraus, G.F., Druzhinina, I., Gams, W., Bissett, J., Zafari, D., Szakacs, G., Koptchinski, A., Prillinger, H., Zare, R. et Kubicek, C.P., 2004**

*Trichoderma brevicompactum* sp. nov.  
Mycologia, 96, 1059-1073.

**Krause, C., Kirschbaum, J., Jung, G. et Brückner, H., 2006**

Sequence diversity of the peptaibol antibiotic suzukacillin-A from the mold *Trichoderma viride*.  
J. Pept. Sci., 12, 321-327.

**Kromhout, D., Menotti, A., Bloemberg, B., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Dontas, A.S., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Karvonen, M., Katan, M., Nissinen, A., Nedeljkovic, S., Pekkanen, J., Pekkarinen, M., Punsar, S., Räsänen, L., Simic, B. et Toshima, H., 1995**

Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-Year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study.  
Prev. Med., 24, 308-315.

**Kumar, G.S. et Das, U.N., 1997**

Cytotoxic action of alpha-linolenic and eicosapentaenoic acids on myeloma cells *in vitro*.  
Prostagl. Leukotr. Ess. Fatty Acids, 56, 285-293.

**Kumazawa, S., Kanda, M., Aoyama, H., Utagawa, M., Kondo, J., Sakamoto, S., Ohtani, H., Mikawa, T., Chiga, I., Hayase, T., Hino, T., Takao, T. et Shimonishi, Y., 1994**

Structural elucidation of aibellin, a new peptide antibiotic with efficiency enhancing activity on rumen fermentation.  
J. Antibiot., 47, 1136-1144.

**Kurahashi, K., Komura, S., Akashi, K. et Nishio, C., 1982**

Biosynthesis of antibiotic peptides polymyxin E and gramicidin A.  
Peptide Antibiotics: Biosynthesis and Functions, Kieinkauf, H., von Döhren, H. (Eds.).  
W. de Gruyter, Berlin, pp. 275-288.

**Kurzatkowski, W., Palissa, H., Van Liempt, H., Von Dohren, H., Kleinkauf, H., Wolf, W.P. et Kurylowicz, W., 1991**

Localization of isopenicillin N synthase in *Penicillium chrysogenum* PQ-96.  
Appl. Microbiol. Biotech., 35, 517-520.

**Laine, R.A., Griffin, P.F., Sweeley, C.C. et Brennan, P.J., 1972**

Monoglucosyloxyoctadecenoic acid, a glycolipid from *Aspergillus niger*.  
Biochemistry, 11, 2267-2271.

**Landreau, A., 2001**

Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii* Oudemans isolée du milieu marin : étude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture.  
Thèse de doctorat, Université de Nantes, 201 p.

**Landreau, A., Pouchus, Y.F., Sallenave-Namont, C., Biard, J.F., Boumard, M.C., Robiou du Pont, T., Mondeguer, F., Goulard, C. et Verbist, J.F., 2002**

Combined use of LC/MS and a biological test for rapid identification of marine mycotoxins produced by *Trichoderma koningii*.  
J. Microbiol. Meth., 48, 181-194.

**Leclerc, G., Goulard, C., Prigent, Y., Bodo, B., Wróblewski, H. et Rebuffat, S., 2001**

Sequences and antimycoplasmic properties of longibrachins LGB II and LGB III, two novel 20-residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*.  
J. Nat. Prod., 64, 164-170.

**Leclerc, G., Rebuffat, S. et Bodo, B., 1998a**

Directed biosynthesis of peptaibol antibiotics in two *Trichoderma* strains. II. Structure elucidation.  
J. Nat. Prod., 51, 178-183.

- Leclerc, G., Rebuffat, S., Goulard, C. et Bodo, B., 1998b**  
Directed biosynthesis of peptaibol antibiotics in two *Trichoderma strains*. I. Fermentation and isolation.  
J. Antibiot., 51, 170-177.
- Lee, S.J., Yeo, W.H., Yun, B.S. et Yoo, I.D., 1999a**  
Isolation and sequence analysis of new peptaibol, boletusin, from *Boletus* spp.  
J. Pept. Sci., 5, 374-378.
- Lee, S.J., Yun, B.S., Cho, D.H. et Yoo, I.D., 1999b**  
Tylopeptins A and B, new antibiotic peptides from *Tylophilus neofelleus*.  
J. Antibiot., 52, 998-1006.
- Leimer, K.R., Rice, R.H. et Gehrke, C.W., 1977**  
Complete mass spectra of N-trifluoroacetyl-n-butyl esters of amino acids.  
J. Chromatogr. A., 141, 121-144.
- Li, G., Butz, D., Dong, B., Park, Y., Pariza, M.W. et Cook, M.E., 2006**  
Selective conjugated fatty acids inhibit guinea pig platelet aggregation.  
Eur. J. Pharmacol., 545, 93-99.
- Li, Z.Y. et Ward, O.P., 1994**  
Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum*.  
J. Ind. Microbiol., 13, 238-241.
- Lomascolo, A., Dubreucq, E., Perrier, V. et Galzy, P., 1994**  
Mycelial lipid composition of three *Penicillium* strains.  
J. Dairy. Sci., 77, 2160-2167.
- Lopes da Silva, T., de Sousa, E., Pereira, P.T., Ferrao, A.M. et Roseiro, J.C., 1998**  
Cellular fatty acid profiles for the differentiation of *Penicillium* species.  
FEMS Microbiol. Lett., 164, 303-310.
- Lösel, D.M., 1988**  
Fungal lipids.  
Microbial lipids, vol. 1. Rattledge, C., Wilkinson, S.G. (Eds.).  
Academic Press, London (UK), pp. 699-806.
- Lunn, J. et Theobald, H.E., 2006**  
The health effects of dietary unsaturated fatty acids.  
Nutr. Bull., 31, 178-224.
- MacKenzie, S.E., Gurusamy, G.S., Piórko, A., Strongman, D.B., Hu, T. et Wright, J.L.C., 2004**  
Isolation of sterols from the marine fungus *Corollospora lacera*.  
Can. J. Microbiol., 50, 1069-1072.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. et Mootz, H.D., 1997**  
Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis.  
Chem. Rev., 97, 2651-2673.
- Martin, J.C. et Valeille, K., 2002**  
Conjugated linoleic acids: All the same or to everyone its own function?  
Reprod. Nutr. Dev., 42, 525-536.
- Massart-Léén, A.M., De Pooter, H., Decloedt, M. et Schamp, N., 1981**  
Composition and variability of the branched-chain fatty acid fraction in the milk of goats and cows.  
Lipids, 16, 286-292.
- Massart-Léén, A.M., Roets, E., Peeters, G. et Verbeke, R., 1983**  
Propionate for fatty acid synthesis by the mammary gland of the lactating goat.  
J. Dairy. Sci., 66, 1445-1454.
- Matha, V., Jegorov, A., Kiess, M. et Brückner, H., 1992**  
Morphological alterations accompanying the effect of peptaibiotics,  $\alpha$ -aminoisobutyric acid-rich secondary metabolites of filamentous fungi, on *Culex pipiens* larvae.  
Tissue Cell, 24, 559-564.

- Matsuura, K., Shima, O., Takeda, Y., Takaishi, Y., Nagaoka, Y. et Fujita, T., 1994**  
Fungal metabolites. XV. Primary structures of antibiotic peptides, hypelcins B-I, B-II, B-III, B-IV and B-V, from *Hypocrea peltata*. Application of electrospray mass spectrometry and electrospray mass spectrometry/mass spectrometry.  
Chem. Pharm. Bull., 42, 1063-1069.
- McAllister, D.J. et De Siervo, A.J., 1975**  
Identification of bisphosphatidic acid and its plasmalogen analogues in the phospholipids of a marine bacterium.  
J. Bacteriol., 123, 302-317.
- Mejanelle, L., Lopez, J.F., Gunde-Cimerman, N. et Grimalt, J.O., 2000**  
Sterols of melanized fungi from hypersaline environments.  
Org. Geochem., 31, 1031-1040.
- Meyer, C.E. et Reusser, F., 1967**  
A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*.  
Experientia, 23, 85-86.
- Mitchell, P.L., Langille, M.A., Currie, D.L. et McLeod, R.S., 2005**  
Effect of conjugated linoleic acid isomers on lipoproteins and atherosclerosis in the Syrian Golden hamster.  
Biochim. Biophys. Acta, 1734, 269-276.
- Mizushima, Y., Hanashima, L., Yamaguchi, T., Takemura, M., Sugawara, F., Saneyoshi, M., Matsukage, A., Yoshida, S. et Sakaguchi, K., 1998**  
A mushroom fruiting body-inducing substance inhibits activities of replicative DNA polymerases.  
Biochem. Biophys. Res. Com., 249, 17-22.
- Mohamed-Benkada, M., 2006**  
Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*.  
Thèse de doctorat, Université de Nantes, 139 p.
- Mohamed-Benkada, M., Montagu, M., Biard, J.F., Mondeguer, F., Vérité, P., Dalgalarondo, M., Bissett, J. et Pouchus, Y.F., 2006**  
New short peptaibols from a marine *Trichoderma* strain.  
Rapid Comm. Mass. Spectrom., 20, 1176-1180.
- Monaco, V., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C., Hanson, P. et Millhauser, G.L., 1999**  
Orientation and immersion depth of a helical lipopeptaibol in membranes using TOAC as an ESR probe.  
Biopolymers, 50, 239-253.
- Moreau, R.A., Young, D.H., Danis, P.O., Powell, M.J., Quinn, C.J., Beshah, K., Slawewski, R.A. et Dilliplane, R.L., 1998**  
Identification of ceramide-phosphorylethanolamine in oomycete plant pathogens: *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, and *Phytophthora capsici*.  
Lipids, 33, 307-317.
- Morris, L.J., 1966**  
Separations of lipids by silver ion chromatography.  
Prog. Lipid. Res., 7, 717-732.
- Mosman, N.T., 1983**  
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.  
J. Immunol. Methods, 65, 55-63.
- Murphy, D.J., 1990**  
Storage lipid bodies in plants and other organisms.  
Prog. Lipid. Res., 29, 299-324.
- Nagan, N. et Zoeller, R.A., 2001**  
Plasmalogens: biosynthesis and functions.  
Prog. Lipid. Res., 40, 199-229.
- Nagao, K. et Yanagita, T., 2005**  
Conjugated fatty acids in food and their health benefits.  
J. Biosci. Bioeng., 100, 152-157.

**Nakagiri, A., Okane, I. et Ito, T., 1999**

Geographical and seasonal distribution of arenicolous marine fungi along the Pacific coast of the Boussou peninsula.  
 IFO Res. Commun., 19, 22-33.

**Nakahara, T., Yokochi, T., Higashihara, T., Tanaka, S., Yaguchi, T. et Honda, D., 1996**

Production of docosahexaenoic and docosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap islands.  
 J. Am. Oil Chem. Soc., 73, 1421-1426.

**Nestel, P., Fujii, A. et Allen, T., 2006**

The *cis*-9,*trans*-11 isomer of conjugated linoleic acid (CLA) lowers plasma triglyceride and raises HDL cholesterol concentrations but does not suppress aortic atherosclerosis in diabetic apoE-deficient mice.  
 Atherosclerosis, 189, 282-287.

**New, A.P., Eckers, C., Haskins, N.J., Neville, W.A., Elson, S., Hueso-Rodriguez, J.A. et Rivera-Sagredo, A., 1996**

Structures of polysporins A-D, four new peptaibols isolated from *Trichoderma polysporum*.  
 Tetrahedron Lett., 37, 3039-3042.

**Niessen, W.M.A., 1999**

Liquid Chromatography - Mass Spectrometry.  
 Marcel Dekker Inc., New York. 634 p.

**Niu, S.L., Mitchell, D.C. et Litman, B.J., 2005**

*Trans* fatty acid derived phospholipids show increased membrane cholesterol and reduced receptor activation as compared to their *cis* analogs.  
 Biochemistry, 44, 4458-4465.

**O'Brien, D.J., Kurantz, M.J. et Kwoczak, R., 1993**

Production of eicosapentaenoic acid by the filamentous fungus *Pythium irregulare*.  
 Appl. Microbiol. Biotech., 40, 211-214.

**Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K. et Shimizu, S., 2005**

Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria.  
 J. Biosci. Bioeng., 100, 355-364.

**Oh, S.U., Lee, S.J., Kim, J.H. et Yoo, I.D., 2000**

Structural elucidation of new antibiotic peptides, atroviridins A, B and C from *Trichoderma atroviride*.  
 Tetrahedron Lett., 41, 61-64.

**Oh, S.U., Yun, B.S., Lee, S.J., Kim, J.H. et Yoo, I.D., 2002**

Atroviridins A-C and neoatroviridins A-D, novel peptaibol antibiotics produced by *Trichoderma atroviride* F80317. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities.  
 J. Antibiot., 55, 557-564.

**Oh, S.U., Yun, B.S., Lee, S.J. et Yoo, I.D., 2005**

Structures and biological activities of novel antibiotic peptaibols neoatroviridins A-D from *Trichoderma atroviride* F80317.  
 J. Microbiol. Biotechnol., 15, 384-387.

**Pagniez, F. et Le Pape, P., 2001**

New fluorometric screening test for possible antifungal drugs.  
 J. Mycol. Med., 11, 73-78.

**Pandey, R.C., Cook, J.C., Jr et Rinehart, K.L., 1977**

High resolution and field desorption mass spectrometry studied and revised structures of Alamethicins I and II. In : Revised structures of Alamethicins I and II.  
 J. Am. Chem. Soc., 99, 8469-8483.

**Pariza, M.W., Park, Y. et Cook, M.E., 2001**

The biologically active isomers of conjugated linoleic acid.  
 Prog. Lipid. Res., 40, 283-298.

**Park, Y. et Pariza, M.W., 2001**

The effects of dietary conjugated nonadecadienoic acid on body composition in mice.  
 Biochim. Biophys. Acta, 1533, 171-174.

**Pedneault, K., Angers, P., Gosselin, A. et Tweddell, R.J., 2006**

Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family Boletaceae.  
Mycol. Res., 110, 1179-1183.

**Peltola, J., Ritieni, A., Mikkola, R., Grigoriev, P.A., Pocsfalvi, G., Andersson, M.A. et Salkinoja-Salonen, M.S., 2004**

Biological effects of *Trichoderma harzianum* peptaibols on mammalian cells.  
Appl. Environ. Microbiol., 70, 4996-5004.

**Petersen, K.R.L. et Koch, J., 1997**

Substrate preference and vertical zonation of lignicolous marine fungi on mooring posts of Oak (*Quercus* sp.) and Larch (*Larix* sp.) in Svanemollen Harbour, Denmark.  
Bot. Mar., 40, 451-463.

**Pilantanapak, A., Jones, E.B.G. et Eaton, R.A., 2005**

Marine fungi on *Nypa fruticans* in Thailand.  
Bot. Mar., 48, 365-373.

**Pillai, M.G., Certik, M., Nakahara, T. et Kamisaka, Y., 1998**

Characterization of triacylglycerol biosynthesis in subcellular fractions of an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*.  
Biochim. Biophys. Acta, 1393, 128-136.

**Pitt, J.I., 1979**

The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*.  
Academic Press, London. 634 p.

**Pohl, C.H., Botha, A., Kock, J.L., Coetzee, D.J. et Botes, P.J., 1997**

The production of  $\gamma$ -linolenic acid by selected members of the Dikaryomycota grown on different carbon sources.  
Anton. Leeuw., 72, 191-199.

**Poirier, L., Montagu, M., Landreau, A., Mohamed-Benkada, M., Grovel, O., Sallenave-Namont, C., Biard, J.F., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C. et Pouchus, Y.F., 2007a**

Peptaibols, stable markers of fungal development in the marine environment.  
Chem. Biodivers., 4, 1116-1128.

**Poirier, L., Quiniou, F., Ruiz, N., Montagu, M., Amiard, J.C. et Pouchus, Y.F., 2007b**

Toxicity assessment of Peptaibols and contaminated sediments on *Crassostrea gigas* embryos.  
Aquat. Toxicol., 83, 254-262.

**Poonyth, A.D., Hyde, K.D. et Peerally, A., 2001**

Colonisation of *Bruguiera gymnorrhiza* and *Rhizophora mucronata* wood by marine fungi.  
Bot. Mar., 44, 75-80.

**Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. et Shai, Y., 1992**

Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes.  
Biochemistry, 31, 12416-12423.

**Pryde, E.H., 1979**

Natural fatty acids and their sources.  
Fatty Acids, Pryde, E.H. (Ed.)  
The American Oil Chemists' Society, Champaign, IL (USA), pp. 1-28.

**Psurek, A., Neusüb, C., Degenkolb, T., Brückner, H., Balaguer, E., Imhof, D. et Scriba, G.K.E., 2006**

Detection of new amino acid sequences of alamethicins F30 by nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry.  
J. Pept. Sci., 12, 279-290.

**Qi, J., Ojika, M. et Sakagami, Y., 2000**

Termitomycesphins A-D, Novel Neurotogenic Cerebrosides from the Edible Chinese Mushroom *Termitomyces albuminosus*.  
Tetrahedron, 56, 5835-5841.

**Ramesh, G. et Das, U.N., 1998**

Effect of *cis*-unsaturated fatty acids on Meth-A ascitic tumour cells *in vitro* and *in vivo*.  
Cancer Lett., 123, 207-214.

**Raper, K.B. et Thom, C., 1949**

A manual of the Penicillia.  
Williams & Wilkins, Baltimore, MA (USA). 875 p.

**Ravishankar, J.P., Muruganandam, V. et Suryanarayanan, T.S., 1994**

Effect of salinity on fatty acid composition of *Cirrenelia pygmea*, an obligate marine fungus.  
Bot. Mar., 37, 479-481.

**Rebuffat, S., Conraux, L., Massias, M., Auvin-Guette, C. et Bodo, B., 1993**

Sequence and solution conformation of the 20-residue peptaibols, saturnisporins SA II and SA IV.  
Int. J. Pept. Protein. Res., 41, 74-84.

**Rebuffat, S., El Hajji, M., Hennig, P., Davoust, D. et Bodo, B., 1989**

Isolation, sequence, and conformation of seven trichorzianines B from *Trichoderma harzianum*.  
Int. J. Pept. Protein. Res., 34, 200-210.

**Rebuffat, S., Goulard, C. et Bodo, B., 1995**

Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum* Harzianins HC, proline-rich 14-residue peptaibols.  
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1849-1855.

**Rebuffat, S., Goulard, C., Bodo, B. et Roquebert, M.-F., 1999**

The peptaibols antibiotics from *Trichoderma* soil fungi: structural diversity and membrane properties.  
Recent Res. Devel. Org. Bioorg. Chem, 3, 65-91.

**Rebuffat, S., Goulard, C., Hlimi, S. et Bodo, B., 2000**

Two unprecedented natural Aib-peptides with the (Xaa-Yaa-Aib-Pro) motif and an unusual C-terminus: structures, membrane-modifying and antibacterial properties of pseudokonins KL III and KL VI from the fungus *Trichoderma pseudokoningii*.  
J. Pept. Sci., 6, 519-533.

**Rebuffat, S., Hlimi, S., Prigent, Y., Goulard, C. et Bodo, B., 1996**

Isolation and structural elucidation of the 11-residue peptaibol antibiotic, harzianin HK VI.  
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1, 2021-2027.

**Rebuffat, S., Prigent, Y., Auvin-Guette, C. et Bodo, B., 1991**

Tricholongins BI and BII, 19-residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. Solution structure from two-dimensional NMR spectroscopy.  
Eur. J. Biochem., 201, 661-674.

**Rees, G., Johnson, R.G. et Jones, E.B.G., 1979**

Lignicolous marine fungi from Danish sand dunes.  
Trans. Br. Mycol. Soc., 72, 99-106.

**Rees, G. et Jones, E.B.G., 1985**

The fungi of a coastal sand dune system.  
Bot. Mar., 28, 213-220.

**Reiber, K., Neuhofer, T., Ozegowski, J.H., Von Döhren, H. et Schwecke, T., 2003**

A nonribosomal peptide synthetase involved in the biosynthesis of Ampullosporins in *Sepedonium ampullosporum*.  
J. Pept. Sci., 9, 701-713.

**Rezanka, T., Rozentsvet, O.A. et Dembitsky, V.M., 1999**

Characterization of the hydroxy fatty acid content of *Basidiomycotina*.  
Folia Microbiol., 44, 635-641.

**Rifai, M.A., 1969**

A revision of the genus *Trichoderma*.  
Mycol. Papers, 116, 1-56.

**Ritieni, A., Fogliano, V., Nanno, D., Randazzo, G., Altomare, C., Perrone, G., Bottalico, A., Maddau, L. et Marras, F., 1995**

Paracelsin E, a new peptaibol from *Trichoderma saturnisporum*.  
J. Nat. Prod., 58, 1745-1748.

- Ritzau, M., Heinze, S., Dornberger, K., Berg, A., Fleck, W., Schlegel, B., Härtl, A. et Gräffe, U., 1997**  
Ampullosporin, a new peptaibol-type antibiotic from *Sepedonium ampullosporum* HKI-0053 with neuroleptic activity in mice.  
J. Antibiot., 50, 722-728.
- Roach, J.A.G., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P. et Kramer, J.K.G., 2002**  
Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers.  
Anal. Chim. Acta, 465, 207-226.
- Rosset, R., Caude, M. et Jardy, A., 1982**  
Chromatographie en Phase Liquide.  
Masson, Paris. 374 p.
- Ruiz, N., Dubois, N., Wielgosz-Collin, G., Robiou du Pont, T., Bergé, J.P., Pouchus, Y.F. et Barnathan, G., 2007**  
Lipid content and fatty acid composition of a marine-derived *Trichoderma longibrachiatum* strain cultured by agar surface and submerged fermentations.  
Process Biochem., 42, 676-680.
- Ruzicka, S., Edgerton, D., Norman, M. et Hill, T., 2000**  
The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils.  
Soil Bio. Biochem., 32, 989-1005.
- Sabareesh, V. et Balaram, P., 2006**  
Tandem electrospray mass spectrometric studies of proton and sodium ion adducts of neutral peptides with modified N- and C- termini: synthetic model peptides and microheterogeneous peptaibol antibiotics.  
Rapid Comm. Mass. Spectrom., 20, 618-628.
- Sallenave, C., 1999**  
Etude de la flore fongique des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire, recherche de souches toxigènes.  
Thèse de doctorat, Université de Nantes, 194 p.
- Sallenave, C., Pouchus, Y.F., Bardouil, M., Lassus, P., Roquebert, M.F. et Verbist, J.F., 1999**  
Bioaccumulation of mycotoxins by shellfish: Contamination of mussels by metabolites of a *Trichoderma koningii* strain isolated in the marine environment.  
Toxicon, 37, 77-83.
- Sallenave-Namont, C., Pouchus, Y.F., Robiou du Pont, T., Lassus, P. et Verbist, J.F., 2000**  
Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas.  
Mycopathologia, 149, 21-25.
- Sansom, M.S.P., 1993a**  
Alamethicin and related peptaibols - model ion channels.  
Eur. Biophys J., 22, 105-124.
- Sansom, M.S.P., 1993b**  
Structure and function of channel-forming peptaibols.  
Q. Rev. Biophys., 26, 365-421.
- Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E. et Kubicek, C.P., 1994**  
Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi.  
Appl. Environ. Microbiol., 60, 4364-4370.
- Seidel, V. et Taylor, P.W., 2004**  
*In vitro* activity of extracts and constituents of *Pelagonium* against rapidly growing mycobacteria.  
Int. J. Antimicrob. Agents, 23, 613-619.
- Serpinet, J., 1995**  
Introduction à la Chromatographie en Phase Gazeuse.  
Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Tranchant, J., Arpino, P., Prevot, A., Serpinet, J., Vergnol, A., Witier, P. (Eds.).  
Masson, Paris, pp. 2-11.

**Serra, M., Pina, B., Bujons, J., Camps, F. et Fabrias, G., 2006**

Biosynthesis of 10,12-dienoic fatty acids by a bifunctional  $\Delta^{11}$ desaturase in *Spodoptera littoralis*.  
Insect Biochem. Mol. Biol., 36, 634-641.

**Serrano-Carreón, L., Hathout, Y., Bensoussan, M. et Belin, J.M., 1992a**

Lipid accumulation in *Trichoderma* species.  
FEMS Microbiol. Lett., 93, 181-187.

**Serrano-Carreón, L., Hathout, Y., Bensoussan, M. et Belin, J.M., 1992b**

Quantitative separation of *Trichoderma* lipid classes on a bonded phase column.  
J. Chromatogr. A., 584, 129-133.

**Shaumann, K., 1993**

Marine Pilze.  
Mikrobiologie des Meeresbodens, Meyer-Reil, L.A., Köster, M. (Eds.).  
Gustav Fisher, pp. 144-195.

**Shirasaka, N., Umehara, T., Fukuda, Y., Yoshizumi, H. et Shimizu, S., 2005**

The characteristics of desaturation of *Trichoderma* sp. AM076 and formation of 9,12,15-hexadecatrienoic acid (16:3 $\omega$ 1) through  $\Delta^{15}$  desaturation of 9,12-hexadecadienoic acid.  
Mycoscience, 46, 329-333.

**Shirasaka, N., Umehara, T., Murakami, T., Yoshizumi, H. et Shimizu, S., 1998**

Microbial conversion of palmitoleic acid to 9,12-hexadecadienoic acid (16:2 $\omega$ 4) by *Trichoderma* sp. AM076.  
J. Am. Oil Chem. Soc., 75, 717-720.

**Singh, A. et Ward, O.P., 1996**

Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210.  
J. Ind. Microbiol., 16, 370-373.

**Singh, A., Wilson, S. et Ward, O.P., 1996**

Docosahexaenoic acid (DHA) production by *Thraustochytrium* sp. ATCC 20892.  
World J. Microbiol. Biotechnol., 12, 76-81.

**Singh, R.B., Dubnov, G., Niaz, M.A., Ghosh, S., Singh, R., Rastogi, S.S., Manor, O., Pella, D. et Berry, E.M., 2002**

Effect of an Indo-Mediterranean diet on progression of coronary artery disease in high risk patients (Indo-Mediterranean Diet Heart Study): a randomised single-blind trial.  
The Lancet, 360, 1455-1461.

**Smith, A., 1952**

The crystal structure of the urea-hydrocarbon complexes.  
Acta Cryst., 5, 224-235.

**Solov'eva, N.L., Konova, I.V., Galanina, L.A. et Babanova, N.K., 1997**

Lipids of *Pythium debarianum*.  
Mikrobiologiya, 66, 397-401.

**Somashekar, D., Venkateshwaran, G., Sambaiah, K. et Lokesh, B.R., 2003**

Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi.  
Process Biochem., 38, 1719-1724.

**Somashekar, D., Venkateshwaran, G., Sridaya, C., Krishnanand, Sambaiah, K. et Lokesh, B.R., 2001**

Efficacy of extraction methods for lipid and fatty acid composition from fungal cultures.  
World J. Microbiol. Biotechnol., 17, 317-320.

**Sonntag, N.O.V., 1979**

Separation of fatty acids.  
Fatty Acids, Pryde, E.H. (Ed.)  
The American Oil Chemists' Society, Champaign, IL (USA), pp. 125-156.

**Sparrow, J.F.K., 1934**

Observation of marine phycomycetes collected in Denmark.  
Dansk Bot. Ark., 6, 1-24.

**Sponga, F., Cavaletti, L., Lazzarini, A., Borghi, A., Ciciliato, I., Losi, D. et Marinelli, F., 1999**

Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms.  
J. Biotechnol., 70, 65-69.

**Stahl, P.D. et Klug, M.J., 1996**

Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition.  
Appl. Environ. Microbiol., 62, 4136-4146.

**Stanley, S.J., 1992**

Observations on the seasonal occurrence of marine endophytic and parasitic fungi.  
Can. J. Bot., 70, 2089-2096.

**Steinke, T.D. et Jones, E.B.G., 1993**

Marine and mangrove fungi from the Indian Ocean coast of South Africa.  
S. Afr. J. Bot., 59, 385-390.

**Stredansky, M., Conti, E. et Salaris, A., 2000a**

Production of polyunsaturated fatty acids by *Pythium ultimum* in solid-state cultivation.  
Enzyme Microbial Technol., 26, 304-307.

**Stredansky, M., Conti, E., Stredanska, S. et Zanetti, F., 2000b**

$\gamma$ -Linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace.  
Bioresour. Technol., 73, 41-45.

**Sumner, J.L., Morgan, E.D. et Evans, H.C., 1969**

The effect of growth temperature on the fatty acid composition of fungi in the order Mucorales.  
Can. J. Microbiol., 15, 515-520.

**Sun, C.Q., O'Connor, C.J. et Robertson, A.M., 2003**

Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*.  
FEMS Immunol. Med. Microbiol., 36, 9-17.

**Sun, Y., Tian, L., Huang, J., Li, W. et Pei, Y.H., 2006**

Cytotoxic sterols from marine-derived fungus *Penicillium* sp.  
Nat. Prod. Res., 20, 381-384.

**Tachikawa, E., Takahashi, S., Furumachi, K., Kashimoto, T., Iida, A., Nagaoka, Y., Fujita, T. et Takaishi, Y., 1991**

Trichosporin-B-III, an  $\alpha$ -aminoisobutyric acid-containing peptide, causes  $Ca^{2+}$ -dependent catecholamine secretion from adrenal medullary chromaffin cells.  
Mol. Pharmacol., 40, 790-797.

**Takaishi, Y., Terada, H. et Fujita, T., 1980**

The effect of two new peptide antibiotics, the hypelcins, on mitochondrial function.  
Experientia, 36, 550-552.

**Thirumalachar, M.J., 1968**

Antiamoebin, a new antiprotozoal-anthelmintic antibiotic. I. Production and biological studies.  
Hindustan Antibiot. Bull., 10, 287-289.

**Tokura, R., 1982**

Arenicolous marine fungi from Japanese beaches.  
Trans. Mycol. Soc. Japan, 23, 423-433.

**Tokura, R., 1984**

Sand-inhabiting marine fungi from Japanese beaches.  
Bot. Mar., 27, 567-569.

**Toledo, M.S., Levery, S.B., Straus, A.H., Suzuki, E., Momany, M., Glushka, J., Moulton, J.M. et Takahashi, H.K., 1999**

Characterization of sphingolipids from mycopathogens: factors correlating with expression of 2-hydroxy fatty acyl (E)- $\Delta^3$ -unsaturation in cerebrosides of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Aspergillus fumigatus*.  
Biochemistry, 38, 7294-7306.

**Tossi, A., Sandri, L. et Giangaspero, A., 2002**

New consensus hydrophobicity scale extended to non-proteinogenic amino acids.  
Peptides 2002, Proceedings of the 27<sup>th</sup> European Peptide Symposium, Benedetti, E., Pedone, C. (Eds.).  
Napoli, Italy, pp. 416-417.

**Traynelis, V.C., Zaheer, A. et Sahu, S.K., 2002**

Opposite effects of *cis*-parinaric acid on activities of p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinases in malignant rat astrocytoma cells.  
Inter. Congress Series, vol. 1247.  
pp. 297-309.

**Tsantrizos, Y.S., Pischos, S. et Sauriol, F., 1996**

Structural assignment of the peptide antibiotic LP237-F8, a metabolite of *Tolypocladium geodes*.  
J. Org. Chem., 61, 2118-2121.

**Uauy, R.D., Birch, D.G., Birch, E.E., Tyson, J.E. et Hoffman, D.R., 1990**

Effect of dietary omega-3 fatty acids on retinal function of very-low-birth-weight neonates.  
Pediatr. Res., 28, 485-492.

**Velosaotsy, N.E., 2005**

Etude de lipides d'éponges marines - Phospholipides, acides gras, stérols - Identification et évaluation pharmacologique de métabolites secondaires.  
Thèse de Doctorat, Université de Nantes, 176 p.

**Velosaotsy, N.E., Genin, E., Nongonierma, R., Al-Lihaibi, S., Kornprobst, J.M., Vacelet, J. et Barnathan, G., 2004**

Phospholipid distribution and phospholipid fatty acids in four Saudi Red sea sponges.  
Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova, 68, 639-645.

**Villas Boas, M.H., Egge, H., Pohlentz, G., Hartmann, R. et Bergter, B.E., 1994**

*N*-2'-hydroxyoctadecenoyl-1-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-9-methyl-4,8-sphingadienine from species of *Aspergillus*.  
Chem. Phys. Lipids, 70, 11-19.

**Wada, S., Iida, A., Akimoto, N., Kanai, M., Toyama, N. et Fujita, T., 1995**

Fungal metabolites. XIX. Structural elucidation of channel-forming peptides, trichorovins-I-XIV, from the fungus *Trichoderma viride*.  
Chem. Pharm. Bull., 43, 910-915.

**Wada, S., Nishimura, T., Iida, A., Toyama, N. et Fujita, T., 1994**

Primary structures of antibiotic peptides, trichocellins-A and -B from *Trichoderma viride*.  
Tetrahedron Lett., 35, 3095-3098.

**Wagner-Merner, D.T., 1972**

Arenicolous fungi from the south and central gulf coast of Florida.  
Nova Hedwigia, 23, 915-922.

**Wahrburg, U., 2004**

What are the health effects of fat?  
Eur. J. Nutr., 43, 1/6-1/11.

**Ward, O.P. et Singh, A., 2005**

Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production.  
Process Biochem., 40, 3627-3652.

**Watson, J.T., 1985**

Introduction to Mass Spectrometry.  
Raven Press, New York. 351 p.

**Wei, X., Yang, F. et Straney, D.C., 2005**

Multiple non-ribosomal peptide synthetase genes determine peptaibol synthesis in *Trichoderma virens*.  
Can. J. Microbiol., 51, 423-429.

**Whitmore, L., Chugh, J.K., Snook, C.F. et Wallace, B.A., 2003**

The peptaibol Database: a sequence and structure resource.  
J. Pept. Sci., 9, 663-665.

**Whitmore, L. et Wallace, B.A., 2004**

The Peptaibol Database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. *Nucleic Acids Res.*, 32, D593-594.

**Whittaker, R.H., 1969**

New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*, 163, 150-160.

**Wiest, A., Grzegorski, D., Xu, B.W., Goulard, C., Rebuffat, S., Ebbole, D.J., Bodo, B. et Kenerley, C., 2002**

Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J. Biol. Chem.*, 277, 20862-20868.

**Willett, W.C., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Rosner, B.A., Hennekens, C.H. et Stampfer, M.J., 1993**

Intake of *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *The Lancet*, 341, 581-585.

**Wright Steele, C., 1967**

Fungus population in marine waters and coastal sands of the Hawaiian, Line, and Phoenix islands. *Pac. Sci.*, 21, 317-331.

**Xiao-Yan, S., Qing-Tao, S., Shu-Tao, X., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S. et Yu-Zhong, Z., 2006**

Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.*, 260, 119-125.

**Yaguchi, T., Tanaka, S., Yokochi, T., Nakahara, T. et Higashihara, T., 1997**

Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 1431-1434.

**Yamada, H., Shimizu, S. et Shinmen, Y., 1987**

Production of arachidonic acid by *Mortierella elongata* 1S-5. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 785-790.

**Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T. et Nakahara, T., 1998**

Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 49, 72-76.

**Yue, J.M., Chen, S.N., Lin, Z.W. et Sun, H.D., 2001**

Sterols from the fungus *Lactarium volemus*. *Phytochemistry*, 56, 801-806.

**Yun, B.S., Yoo, I.D., Kim, Y.H., Kim, Y.S., Lee, S.J., Kim, K.S. et Yeo, W.H., 2000**

Peptavirins A and B, two new antiviral peptaibols against TMV infection. *Tetrahedron Lett.*, 41, 1429-1431.

**Zheng, C.J., Yoo, J.S., Lee, T.G., Cho, H.Y., Kim, Y.H. et Kim, W.G., 2005**

Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.*, 579, 5157-5162.

**Zhu, L., Zhang, X., Ji, L., Song, X. et Kuang, C., 2007**

Changes of lipid content and fatty acid composition of *Schizochytrium limacinum* in response to different temperatures and salinities. *Process Biochem.*, 42, 210-214.

**Zhu, M., Yu, L.J., Liu, Z. et Xu, H.B., 2004**

Isolating *Mortierella alpina* strains of high yield of arachidonic acid. *Lett. Appl. Microbiol.*, 39, 332-335.

**Zhu, M., Zhou, P.P. et Yu, L.J., 2002**

Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresour. Technol.*, 84, 93-95.

**Zlotkin, E., Fraenkel, G., Miranda, F. et Lissitzky, Y.S., 1971**

The effect of scorpion venom on blowfly larvae. A new method for the evaluation of scorpion venom potency. *Toxicon*, 9, 1-8.

Annexes

# Annexes

---

# Annexe 1 : Matériels utilisés

- Matériel chromatographique

- CCM

Plaques CCM analytiques : feuilles de polyester ou d'aluminium 20 x 20 cm, 0,2 mm d'épaisseur de gel de silice (60 Å-15µm) avec indicateur de fluorescence 60F<sub>254</sub>, SDS.

- Chromatographie liquide sur colonne ouverte

Adsorbant : silice 60 Å, granulométrie 40-63 µm, SDS.  
Colonne de verre avec coton cellulosique ou fritté.

- CLHP

Manomètre : 806 module manométrique, Gilson  
Pompe : 305 pump, Gilson  
Pression : 100 bar  
Injecteur : vanne Rheodyne, boucle 750 µL  
Détecteur : 115 UV, Gilson  
Imprimante : SE 120, BBC Guerz Metrawatt  
Colonnes  
Chompack ChromSpher Lipids 5 µm silver ion, 250 x 4,6 mm, Varian  
Intersphère ODS-1 RP18 5 µm, 250 x 4,6 mm Interchim  
Intersil ODS-3 RP18 5 µm, 250 x 10 mm, Interchim

Seringue : 500 µL, Hamilton

- Couplage CPG/SM

- + Analyse des acides gras

Les analyses d'acides gras ont été réalisées avec deux appareils :

- 1/ Chromatographe : HP 5890 série II, Hewlett-Packard  
Colonne capillaire : 30 m x 0,32 mm, apolaire DB-1, épaisseur de phase 0,25 µm  
Spectromètre de masse : HP 5989A, Hewlett-Packard,  
Intégrateur HP 98785, Hewlett-Packard  
Impact électronique : 70 eV  
Opérateur : G. Nourrisson, Laboratoire de Synthèse Organique, UMR CNRS 6513, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Nantes.
- 2/ Chromatographe : Agilent 6890 série II, Agilent  
Passeur d'échantillons HP 7673A liquid autosampler  
Colonne capillaire : 60 m x 0,25 mm, apolaire CP-Sil 5 CB low bleed, épaisseur de phase 0,25 µm, Chrompack  
Spectromètre de masse : Agilent model 5973N, Agilent  
Intégrateur Agilent 5973 MS/TOP, Agilent  
Impact électronique : 70 eV  
Opérateur : N. Dubois, Département des Sciences et Techniques Alimentaires Marines, IFREMER Centre de Nantes.

- + Analyse des acides aminés

Chromatographe : Agilent 6890 série, Agilent  
Passeur d'échantillons HP 7673A liquid autosampler  
Colonne capillaire : 30 m x 0,25 mm, apolaire Optima<sup>®</sup> 5 MS, épaisseur de phase 0,25 µm, Macherey-Nagel  
Spectromètre de masse : HP 5973, Hewlett Packard

Intégrateur ChemStation Integrator, Agilent

Impact électronique : 70 eV

Opérateur : Pr. P. Vérité, Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté mixte de Médecine-Pharmacie, Université de Rouen

- Matériel spectrométrique

Spectromètre de masse basse résolution LCQ, source d'ionisation ESI, analyseur TI, Finnigan, Thermo Separation Products

Logiciel d'acquisition et de traitement des données Xcalibur

Partenariat SMAB/ Laboratoire DEL-PN, IFREMER, centre de Nantes

- Solvants

Hexane, dichlorométhane, acétone, méthanol : distillés avant utilisation (SDS)

Eau ultra pure (Milli Q)

Spectrométrie de masse, méthanol : qualité CLHP (Baker)

- Réactifs

Réactif à la vanilline sulfurique : préparation extemporanée, 1 g de vanilline (Aldrich) dans 100 mL d'acide sulfurique concentré (SDS)

Réactif à l'orcinol : dissolution de 0,167 g de chlorure de fer III (Prolabo) dans une solution d'acide sulfurique à 10% (Solution 1). Dilution de 0,600 g d'orcinol (Sigma) dans 1 ml d'éthanol (Solution 2). Mélange des solutions 1 et 2.

- Tests biologiques

- Solvants : méthanol, éthanol, isopropanol, DMSO, SDS, distillés avant utilisation, eau distillée, qualité Normapur

- Cultures cellulaires

Matériel consommable (flasques 75cm<sup>2</sup>, microplaques 96 puits, boîtes de Petri), Costar

Milieu de culture et additifs (BME, antibiotiques, etc. ), Eurobio

Réactifs (trypsine, MTT, rouge neutre), Sigma-Aldrich

Lecteur de microplaque ELx 800<sub>UV</sub>, Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments Inc.

Logiciel d'acquisition et de traitement des données, KC Junior. Bio-Tek Instruments Inc.

CO<sub>2</sub> : qualité médicale (Air Liquide Santé).

- Tests sur larves

Matériel consommable (boîtes de Petri), Costar

Larves (rayon pêche, grande surface)

Micro-seringue 10 µl, SGE

- Tests antibiotiques

Matériel consommable (flasques 75cm<sup>2</sup>, microplaques 96 puits, boîtes de Petri) Costar

Milieu de culture : Bouillon nutritif Mueller Hinton, DIFCO® (Becton Dickinson)

- Tests antifongiques

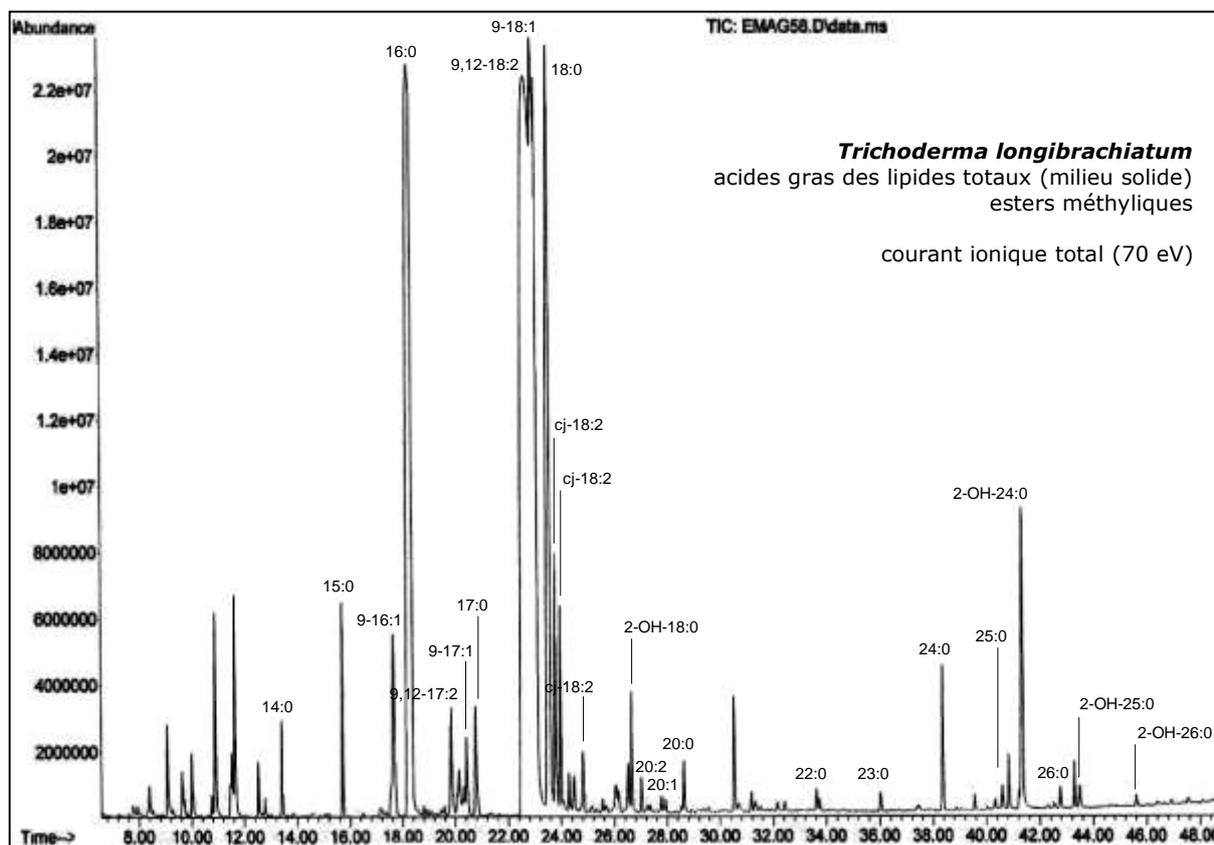
Matériel consommable (microplaques 96 puits, boîtes de Petri), Costar

Milieu de culture RPMI 1640, MOPS, Sigma

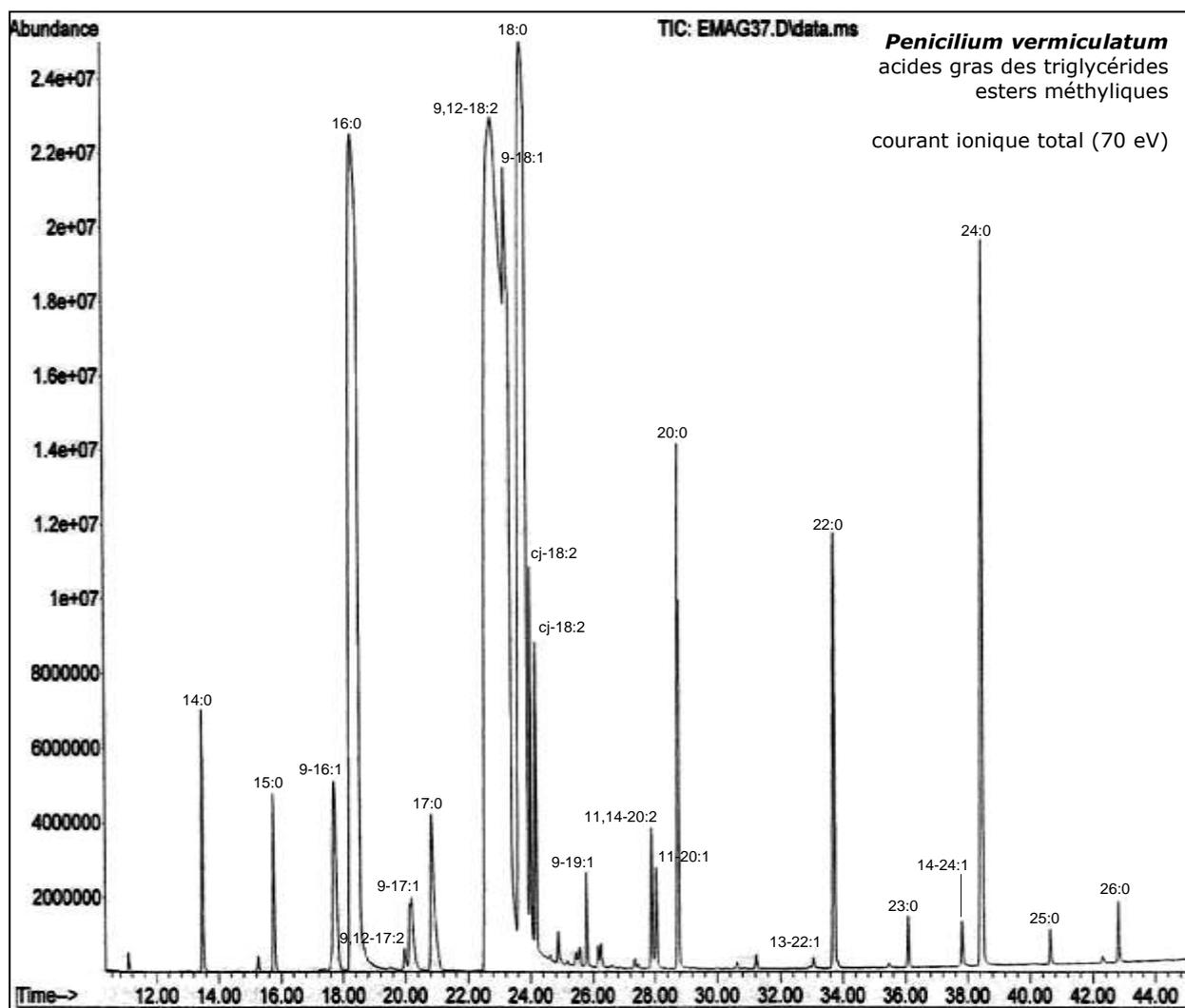
Réactifs (Bleu d'Alamar), Interchim

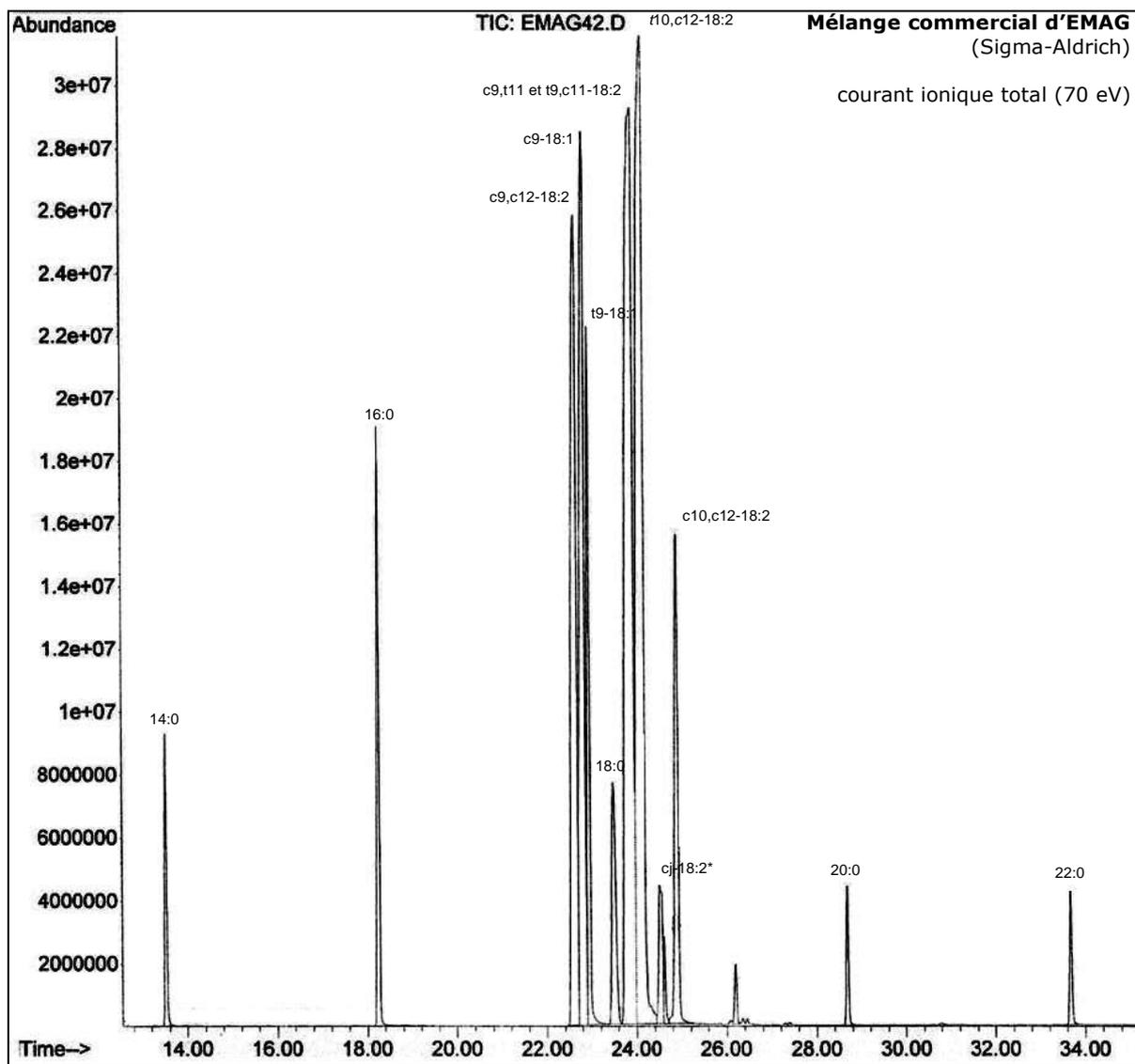
Fluorimètre pour microplaques, Fluorocount, Packard

## Annexe 2 : Chromatogrammes CPG/SM d'EMAG



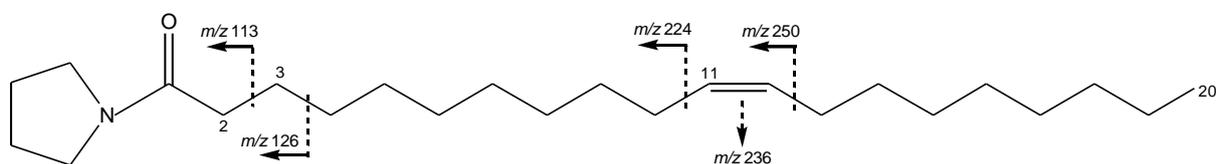
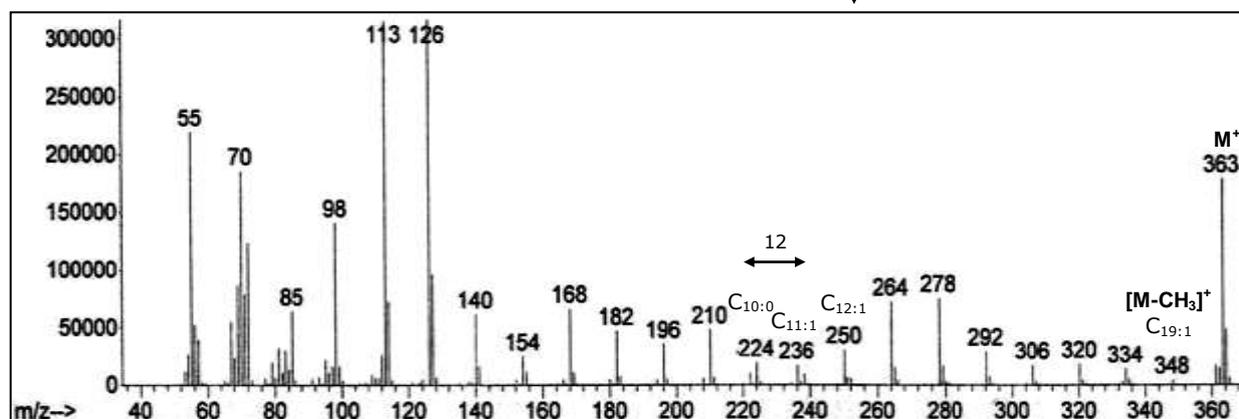
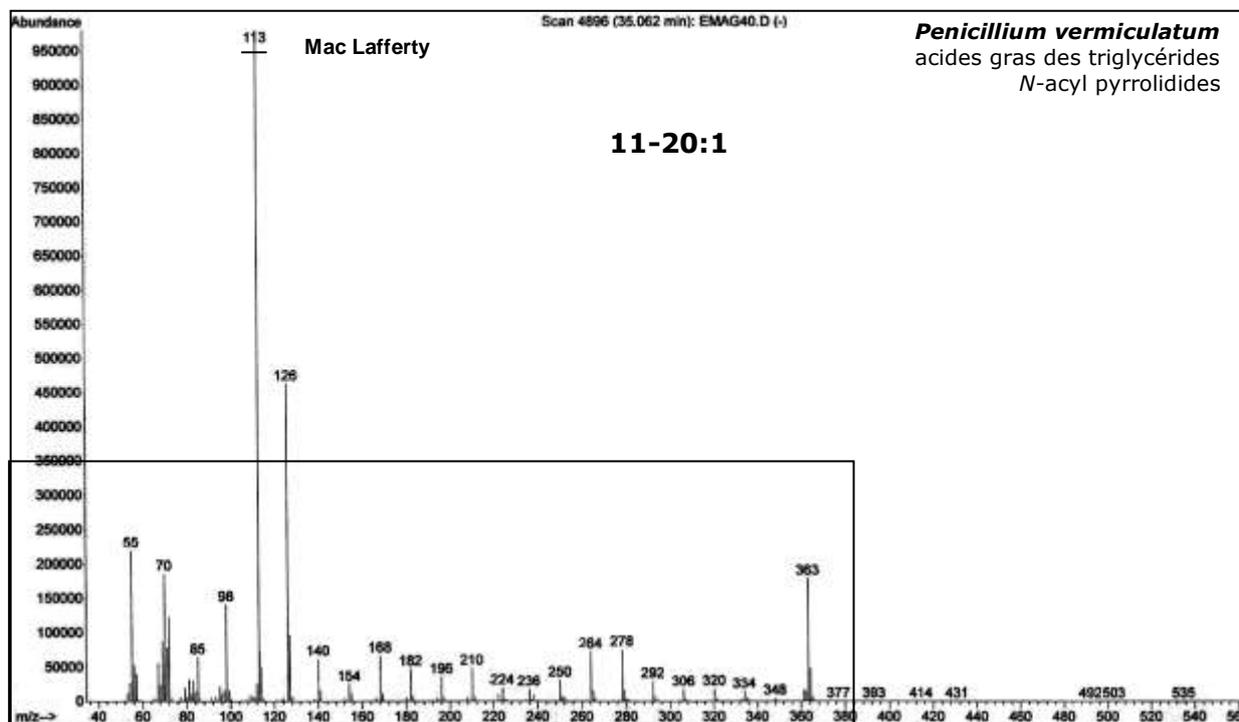


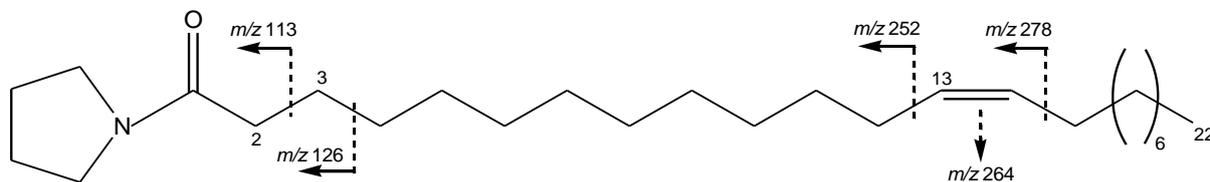
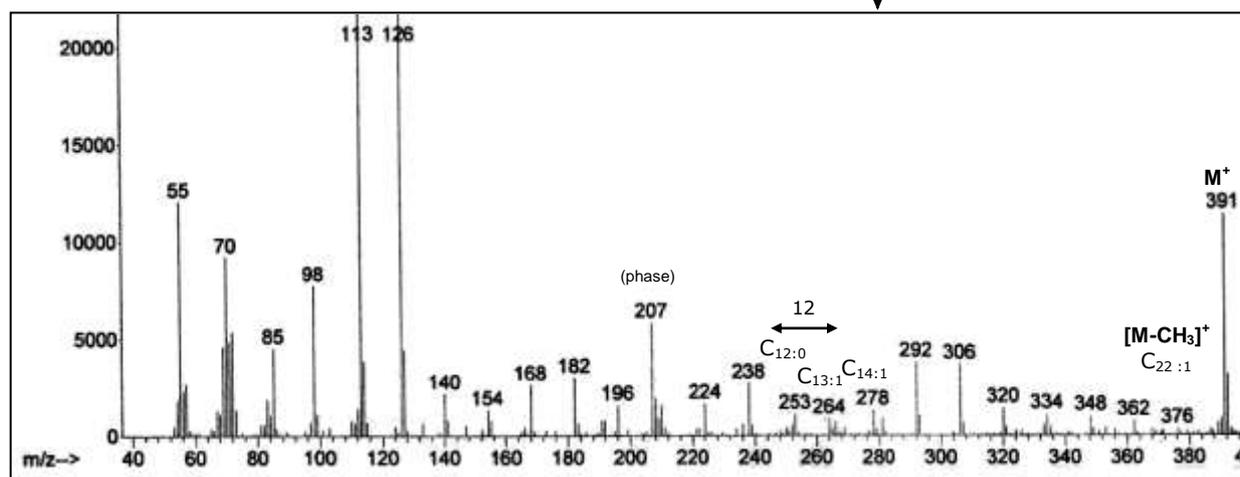
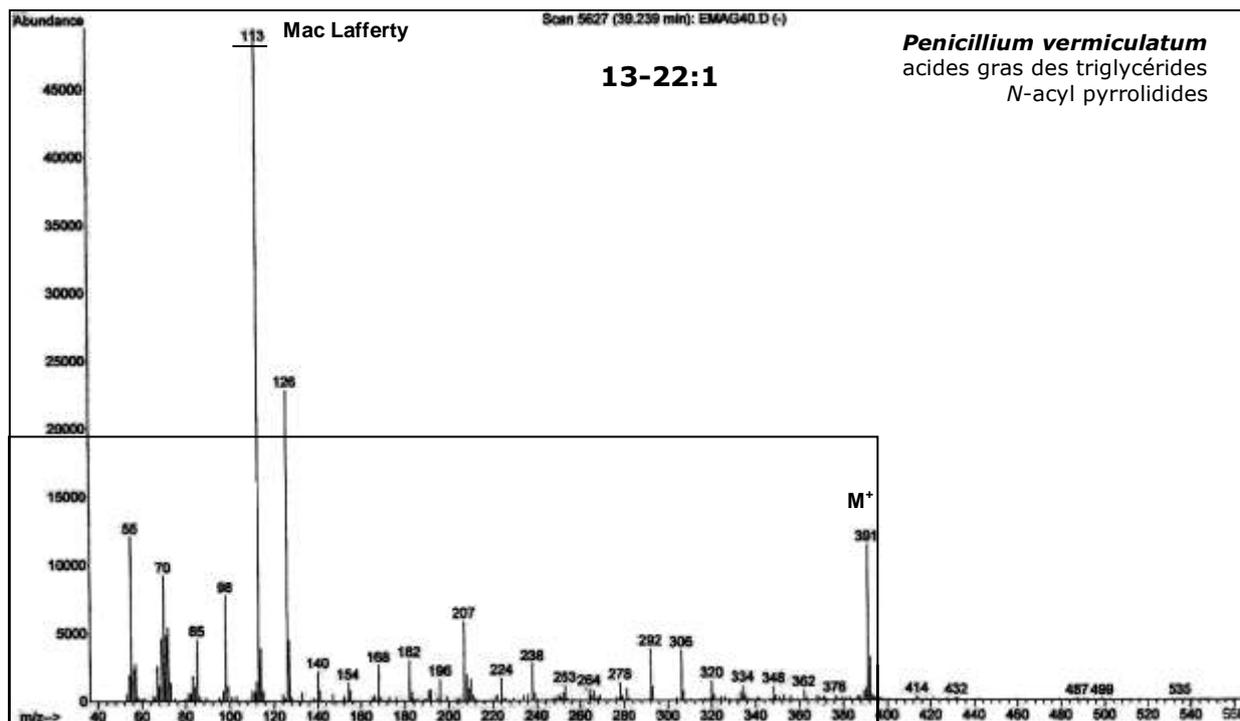


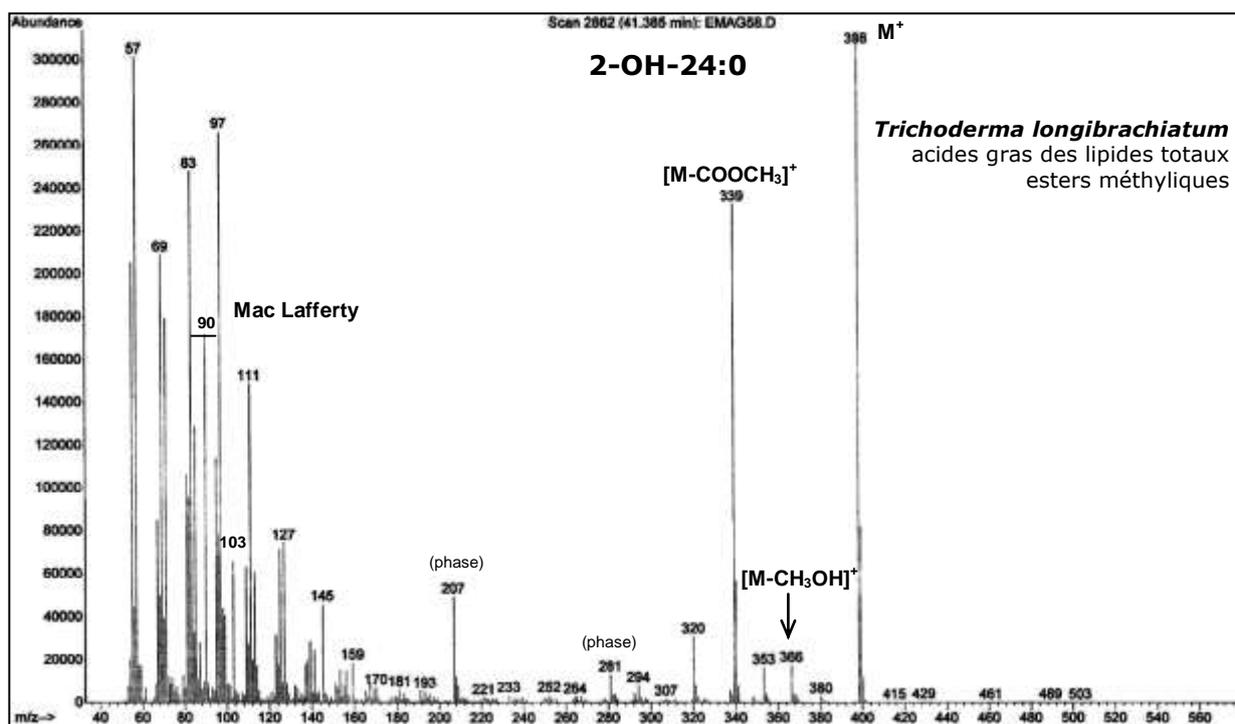
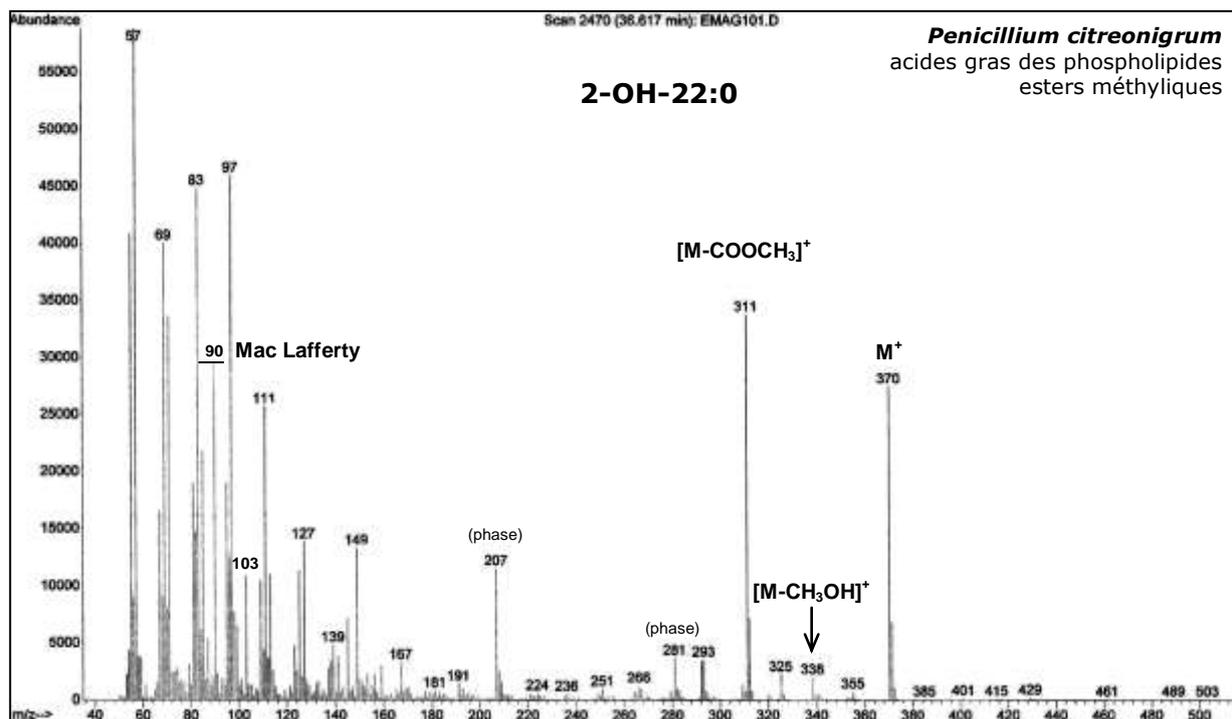


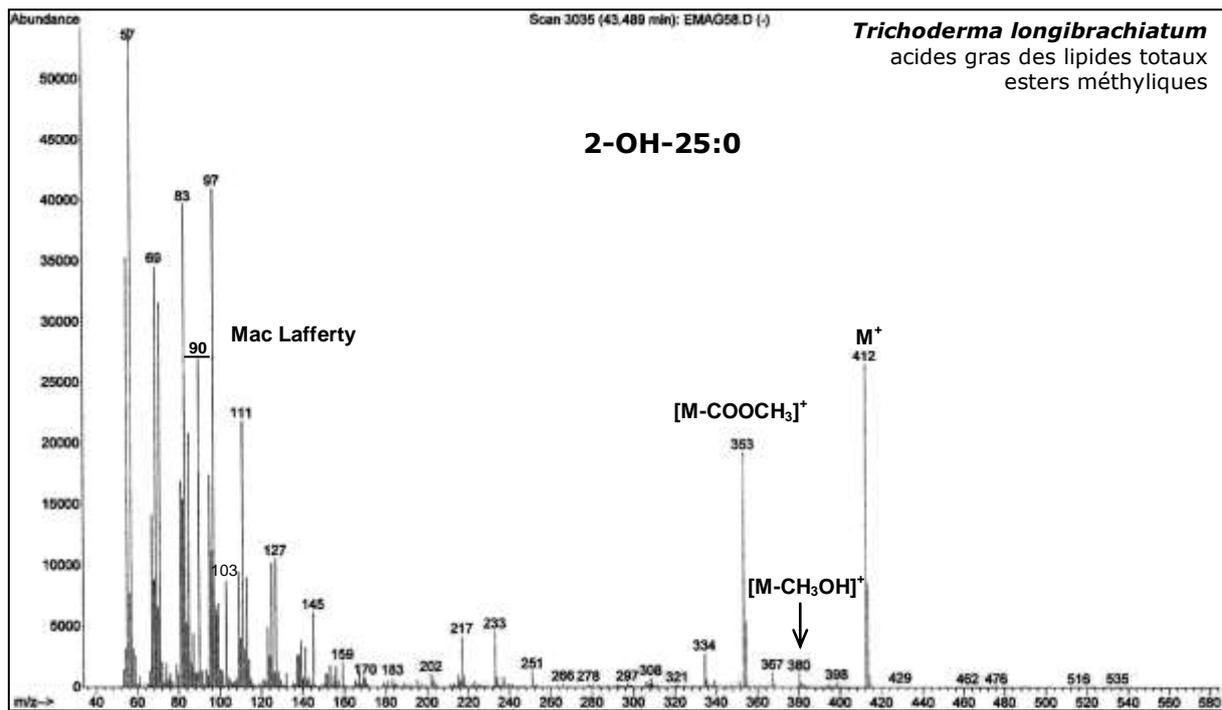
\* mélange d'autres isomères (c9,c11 ; t9,t11 etc.)

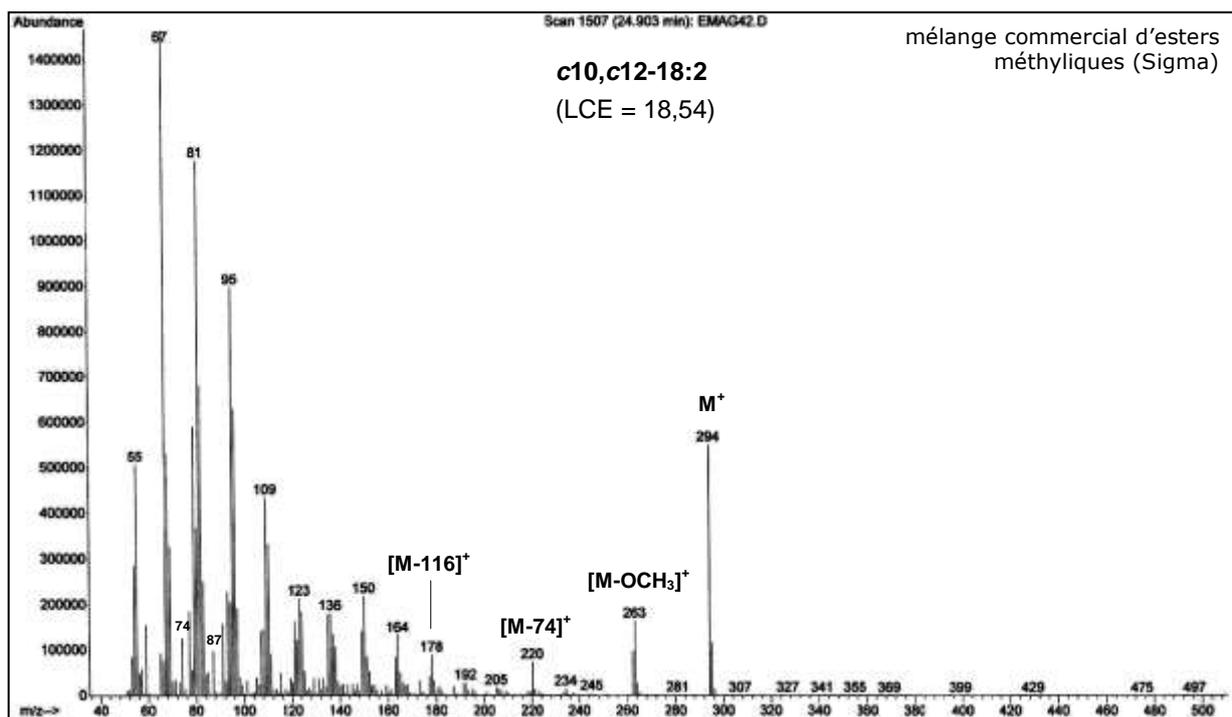
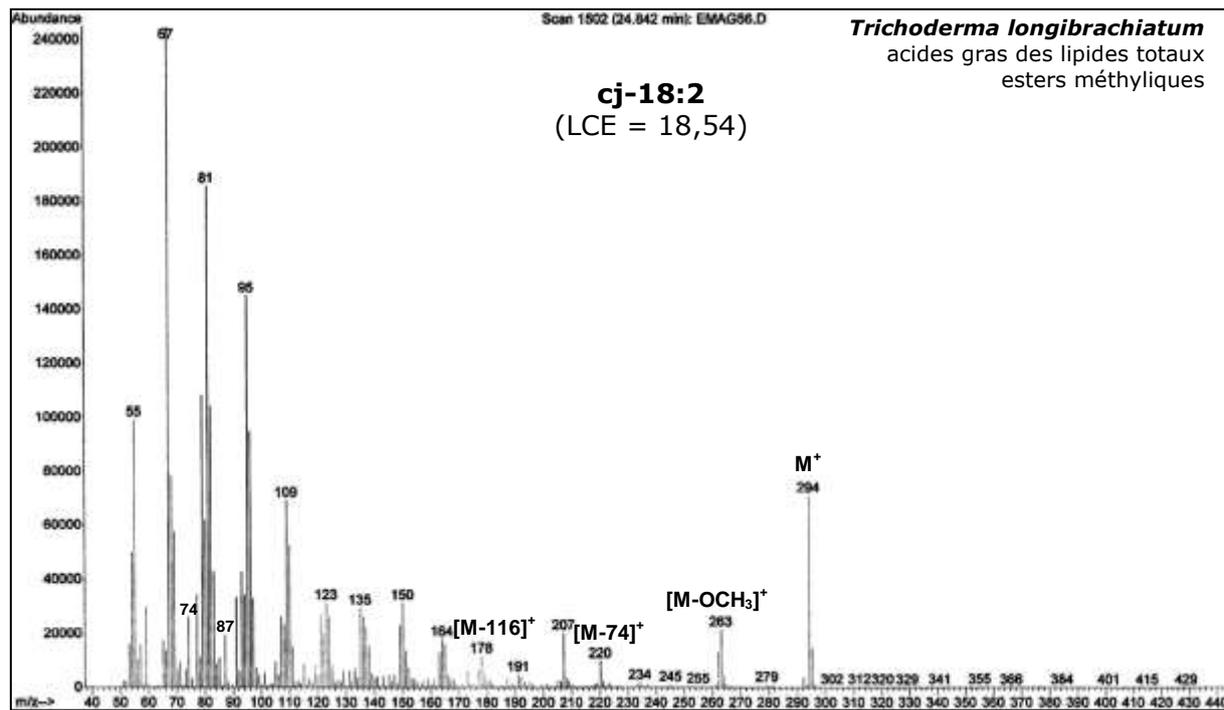
## Annexe 3 : Spectres de masse (EMAG, NAP)



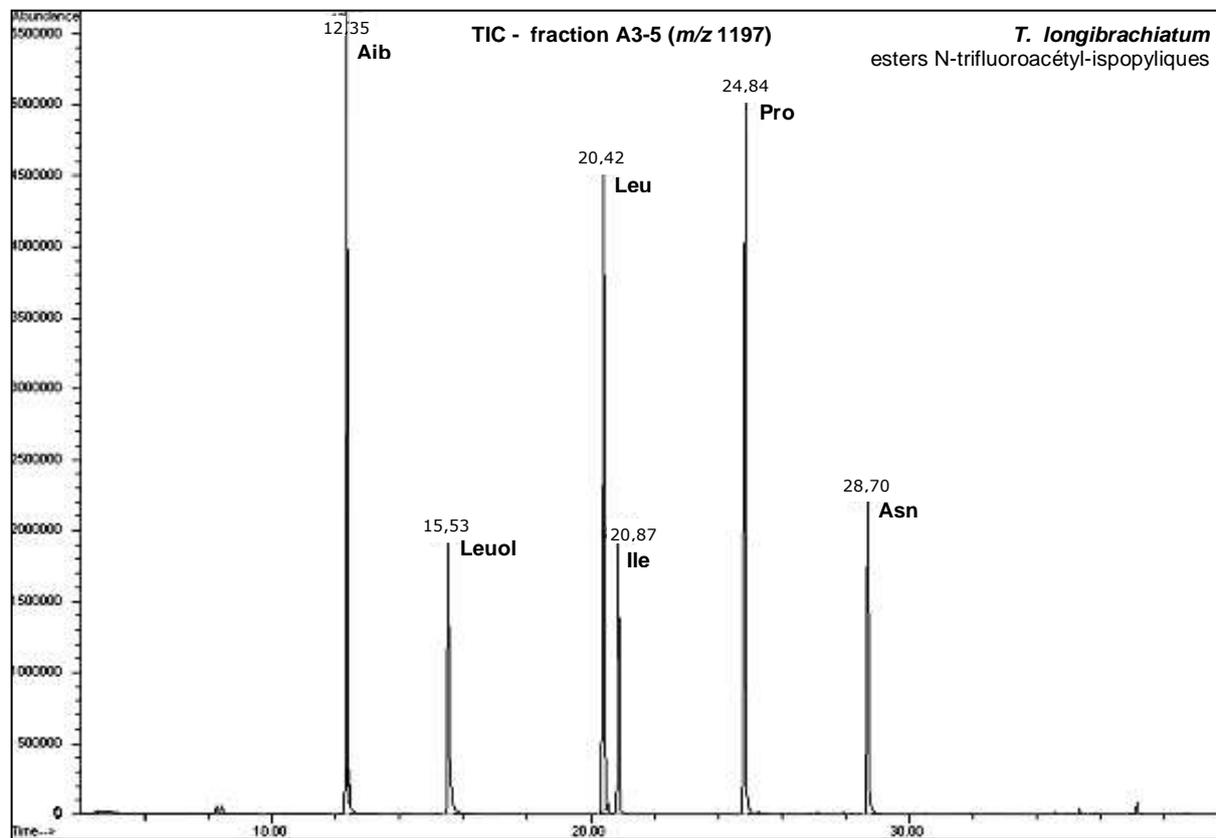








## Annexe 4 : Chromatogramme CPG/SM d'acides aminés



## Annexe 5 : Temps de rétention en GPG/SM des esters *N*-trifluoroacétyl-isopropyliques d'acides aminés de référence

Acides aminés		$t_R$ (min)
Aib	U	12,35
Valol	Vol	12,53
Iva	J	15,09
Leuol	Lol	15,55
Ileol	Iol	16,14
Val	V	17,30
Leu	Lol	20,42
Ile	Iol	20,87
Pro	P	24,84
Asn	N	28,70
Gln	Q	32,50

---

## Micromycètes et métabolites fongiques en milieu marin : isolement, mise en culture de souches, production, identification et évaluation pharmacologique de lipides, acides gras et peptides

La biodiversité des micromycètes en zones conchylicoles ainsi que les métabolites qu'ils produisent en conditions marines ont été évalués au cours de ce travail. L'évolution de la microfonge saprotrophe des zones conchylicoles a été étudiée par la réalisation de prélèvements saisonniers de sédiments sur différents sites côtiers atlantiques. Mis en culture, ces échantillons ont permis d'isoler de nombreuses souches fongiques enrichissant la Mycothèque Marine du Laboratoire. Les micromycètes les plus fréquemment isolés appartiennent à trois genres : *Penicillium*, *Aspergillus* et *Trichoderma*. Quatre souches représentatives de la microfonge saprotrophe, *Penicillium vermiculatum*, *P. citreonigrum*, *Trichoderma longibrachiatum* et *T. harzianum* ont été sélectionnées pour l'étude de leurs métabolites d'intérêt nutritionnel et structural (lipides, acides gras) ou toxiques (peptides).

Dans un premier temps, l'étude a consisté à évaluer la richesse des quatre souches de micromycètes marins sélectionnées en termes de production et d'originalité de lipides, notamment par la recherche d'acides gras valorisables en santé et nutrition. L'analyse des acides gras a montré des compositions proches des souches terrestres avec notamment la présence majoritaire des acides linoléique, oléique et palmitique. Néanmoins, il a été révélé pour la première fois chez ces champignons la présence d'acides gras di- et triinsaturés conjugués en proportion non négligeable en comparaison avec leurs autres sources naturelles. Une souche, *P. citreonigrum*, s'est particulièrement distinguée en produisant une quantité importante de triglycérides et des acides gras conjugués sans précédents tel que l'acide 4-Me-6,8-16:2. Ce dernier a été isolé et purifié (complexation à l'urée et CLHP-Ag<sup>+</sup>) afin d'évaluer ses propriétés biologiques et pharmacologiques.

Dans un second temps, les deux souches de *Trichoderma* ont également été étudiées pour leur production de peptaïbols, peptides linéaires neuroactifs, potentiellement impliqués dans des contaminations de coquillages. Cinquante séquences constituées de 11, 18 ou 20 résidus dont 33 nouvelles ont été isolées et identifiées. La comparaison des profils de production des peptaïbols s'est révélée intéressante dans la différenciation des deux souches de *Trichoderma*. L'application de cette approche à un plus grand nombre de *Trichoderma* sp. pourrait s'avérer être un outil chimiotaxonomique efficace, en particulier pour les peptides à 11 résidus. La méthode d'extraction originale utilisée a permis l'isolement de quantités importantes de peptaïbols jamais atteintes, démontrant son intérêt. Le potentiel toxogène des peptaïbols a été confirmé par la réalisation d'une évaluation pharmacologique sur différents modèles biologiques, confirmant en particulier la forte implication des peptides à longues chaînes.

**Mots-clés :** Micromycètes marins, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium vermiculatum*, *Penicillium citreonigrum*, zones conchylicoles, mycothèque marine, cultures, production lipidique, acides gras conjugués, peptaïbols, trichobranchines, CPG/SM, ESI-TI-SM, CLHP, cytotoxicité, activité antimicrobienne, neuroactivité

---

## Micromycetes and fungal metabolites in marine environment: strains isolation, fungal cultures, production, identification and pharmacological evaluation of lipids, fatty acids and peptides

In this work, micromycetes biodiversity in shellfish farming areas was investigated as well as their fungal metabolites produced in marine conditions. Seasonal collecting of sediment samples were performed on various areas along the French Atlantic coast. Numerous strains have been isolated and are stocked in the marine fungal collection of the laboratory. *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. and *Trichoderma* sp. were the strains most commonly found. Four representative strains, *Trichoderma longibrachiatum*, *T. harzianum*, *Penicillium vermiculatum*, *P. citreonigrum*, were investigated regarding their metabolites with potential interest in human nutrition and membrane structures (lipids, fatty acids) or for their toxicity (peptides).

The biochemical composition of marine micromycetes was evaluated regarding to the production of lipids compared to strains of terrestrial origin. Moreover, fatty acids were investigated for their potential in nutrition and human health. Linoleic, oleic and palmitic acids were the major fatty acids observed. One of the most striking result was the first occurrence of several dienoic and trienoic conjugated fatty acids at relatively high levels compared with their already known natural sources. A strain of *Penicillium citreonigrum* showed marked differences with high amounts of triglycerides and unprecedented conjugated fatty acids such as the 4-Me-6,8-16:2 acid. This one was isolated and purified (urea complexation and Ag<sup>+</sup>-HPLC) in order to evaluate its biological and pharmacological properties.

Then *T. longibrachiatum* and *T. harzianum* were studied regarding to the production of neuroactive linear peptides, peptaïbols, potentially implicated in shellfish contamination. Fifty sequences corresponding to 11-, 18- and 20-residues peptaïbols were identified and 33 were new ones. The strains of *Trichoderma* can be differentiated by their peptaïbol production. The peptaïbol profile could be enhanced for the *Trichoderma* genus and considered as an effective chemotaxonomic tool, especially concerning the 11-residues peptaïbols. The extraction process is original, allowing isolation of high amounts of peptaïbols. Peptaïbols were evaluated on various biological models, confirming especially the implication of long sequence peptaïbols in acute toxicity.

**Keywords:** Marine micromycetes, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium vermiculatum*, *Penicillium citreonigrum*, shellfish farming area, marine fungal collection, cultures, lipid production, conjugated fatty acids, peptaïbols, trichobranchins, GC/MS, ESI-IT-MS, HPLC, cytotoxicity, antimicrobial activity, neuroactivity

---