

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE**

ANNEE 2003

**THESE
Pour le
DIPLÔME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
par**

Xavier RECULEAU-ARNOUD

**Production et étude de toxicité des Peptaïbols
d'une souche marine de *Trichoderma koningii***

Soutenue le 19 décembre 2003, devant un jury composé de :

Président :

Monsieur J.-F. BIARD, Professeur de Pharmacognosie

Membres du Jury :

Monsieur Y.F. POUCHUS, Professeur de Cryptogamie et de Botanique

Madame B. MAULAZ, Praticien Hospitalier, Pharmacie St Jacques

Remerciements

Je voudrais remercier, en premier lieu, le Professeur Yves François Pouchus en sa qualité d'enseignant et de chercheur mais aussi pour son dynamisme et sa bonne humeur.

Je voudrais aussi saluer sa capacité d'écoute et de soutien. Ces deux qualités m'ont beaucoup aidé lors de mon changement d'orientation.

Pour toutes ces années et pour tout cela, merci.

Un grand merci également au Professeur Monique Montagu qui m'a fait l'honneur d'être le président de mon jury et qui m'a éclairé de ses précieux conseils, lors de mon stage de DEA.

Un merci tout particulier à Mme Brigitte Maulaz pour avoir accepté d'être dans mon jury, pour son humanité et sa gentillesse, pour m'avoir également soutenu lors de mon choix de carrière, choix auquel elle a contribué pleinement.

Merci aussi :

- à Mr Thibault Robiou Du Pont, Mlle Céline Tessier et Mme Marie-Claude Boumard, car grâce à leur collaboration et leurs conseils avisés, ils ont largement contribué au bon déroulement de mon stage. Merci pour leur gentillesse, leur disponibilité et surtout leur bonne humeur.

- à Mr Nicolas Ruiz, Mlle Karina Petit et Mr Mustapha Mohamed-Benkada qui m'ont également aidé dans mes travaux et beaucoup encouragé.

- à Mr Jean-François Biard, pour avoir toujours été là et pour m'avoir écouté et guidé tout au long de mes études pharmaceutiques.

A Solène

A mes parents

A Bénédicte et Antoine

A tous mes amis

Sommaire

Liste des figures	10
Liste des tableaux	11
Liste des abréviations	12
Introduction	13
Partie 1 : <i>Trichoderma sp.</i> - Peptaïbols	
Etude bibliographique	15
I - Le genre <i>Trichoderma</i>	15
I-1 Taxonomie	15
<i>I-1-1 Historique du genre</i>	15
<i>I-1-2 Classification actuelle et nouvelles techniques de classification</i>	16
I-2 Ecologie des champignons du genre <i>Trichoderma</i>	18
<i>I-2-1 Présence et distribution</i>	18
<i>I-2-2 Survie dans le sol</i>	19
<i>I-2-3 Croissance in vitro du genre <i>Trichoderma</i></i>	20
I-3 Morphologie des <i>Trichoderma sp.</i>	21
<i>I-3-1 Sporulation</i>	21
<i>I-3-2 Germination</i>	21
<i>I-3-3 Aspects macroscopique et microscopique</i>	22
I-3-3-1 Aspect Macroscopique	22
I-3-3-2 Aspect Microscopique	23
I-4 Métabolites produits par les <i>Trichoderma sp.</i>	25
<i>I-4-1 Utilisation dans le domaine agroalimentaire</i>	25
<i>I-4-2 Utilisation dans le domaine de l'industrie textile et du papier</i>	26
<i>I-4-3 Agents de bio-contrôle</i>	26

I-4-4	<i>Utilisation dans le domaine médical</i>	27
I-4-5	<i>Potentialisation du développement des plantes</i>	28
I-5	Pouvoir pathogène des <i>Trichoderma sp.</i>	29
II	Les peptaïbols	30
II-1	Structure des peptaïbols	30
II-1-1	<i>Structure primaire</i>	30
II-1-2	<i>Structure secondaire</i>	31
II-2	Biosynthèse des peptaïbols	32
II-3	Classification des peptaïbols	33
II-4	Propriétés des peptaïbols	35
II-4-1	<i>Propriétés membranaires</i>	35
II-4-2	<i>Propriétés biologiques</i>	36
Partie 2 : Production et toxicité des peptaïbols - Matériel et méthodes		38
I	Obtention des peptaïbols	38
I-1	La Souche utilisée	38
I-2	Culture fongique	39
I-2-1	<i>Cultures en milieu solide</i>	39
I-2-2	<i>Cultures en milieu liquide</i>	40
I-2-2-1	Préparation de la suspension mère	40
I-2-2-2	Comptage, ensemencement du milieu liquide et culture	41
I-3	Extraction et purification des peptaïbols	43
I-3-1	<i>Extraction du milieu de fermentation</i>	43
I-3-2	<i>Le fractionnement chromatographique</i>	45
II	Analyse des peptaïbols obtenus	46
II-1	Principe de la méthode	46
II-2	Analyse qualitative : détection des peptaïbols	47
II-3	Analyse semi-quantitative relative du mélange de peptaïbols	49

III Etude de l'activité sur larves de Diptères	50
III-1 Réalisation pratique du test	50
III-2 Détermination de la Concentration efficace 50 (CE ₅₀)	51
III-2-1 Recherche des limites d'activité	51
III-2-2 établissement de la courbe d'activité et détermination de la CE ₅₀	
 Partie 3 : Production et toxicité des peptaïbols -	
Résultats et discussion	54
 I Production des peptaïbols	54
 II Analyses des peptaïbols par spectrométrie de masse	56
II-1 Analyse qualitative	56
II-2 Analyse semi-quantitative	61
 III Etudes de toxicité sur larves de Diptères	62
III-1 Pourquoi le test larve ?	62
III-2 Intérêt du test : détermination de la CE ₅₀ de différentes phycotoxines	
III-3 Détermination de la CE ₅₀ des peptaïbols et étude de l'influence des toxines	66
 Conclusion	69
 Bibliographie	71
 Annexe	76

Liste des figures

- Figure P1-1** Aspect macroscopique de *Trichoderma koningii*
- Figure P1-2** Aspect microscopique de *Trichoderma koningii*
- Figure P1-3** Alaméthicine F50
- Figure P1-4** Exemples de peptaïbols appartenant aux trois classes
- Figure P2-1** Protocole d'extraction des milieux liquides
- Figure P2-2** Profil d'abondance isotopique théorique calculé avec le logiciel IsoPro 3.0 pour une formule brute $C_{91}H_{151}N_{23}O_{24}$ (alaméthicine F50)
- Figure P2-3** Spectre MS^2 d'un peptaïbol d'une masse de 1966 Da
- Figure P2-4** Représentation graphique des activités larves en fonction des doses injectées – détermination de la CE_{50}
- Figure P3-1** Synopsis de la production et de l'isolement des peptaïbols
- Figure P3-2** Fullscan de l'échantillon produit par la souche
- Figure P3-3** Zoomscan du massif monoisotopique à 1005,1 m/z
- Figure P3-4** MS^2 de l'ion m/z 1005,1 (énergie de collision 40%, fenêtre 3)
- Figure P3-5** Séquence de la partie C-terminale du peptaïbol au déplacement m/z 1005,1
- Figure P3-6** Représentation des courbes d'activité des phycotoxines étudiées
- Figure P3-7** Représentation graphique des activités larves en fonction des doses injectées pour les peptaïbols
- Figure P3-8** Comparaison graphique de l'activité des peptaïbols avec et sans acide domoïque

Liste des tableaux

Tableau P2-1	La souche de <i>Trichoderma koningii</i> Oudemans étudiée
Tableau P2-2	Toxines pures et concentration des solutions mères
Tableau P2-3	Exemple de recherche des limites d'activité d'une toxine
Tableau P3-1	Enumération des pics représentatifs observés aux différentes m/z et comparaison
Tableau P3-2	Proportion hypothétique de chaque peptaïbol
Tableau P3-3	Tableau récapitulatif des valeurs obtenues lors du " test larve " avec certaines phycotoxines
Tableau P3-4	Valeurs des activités larves et des moyennes respectives pour différentes doses de peptaïbols injectées
Tableau P3-5	Valeurs des activités larves des peptaïbols, à différentes concentrations, après addition d'acide domoïque
Tableau A-1	Valeurs des activités larves pour la saxitoxine et moyennes pour différentes doses de toxines injectées
Tableau A-2	Valeurs des activités larves pour la tétrodotoxine et moyennes pour différentes doses de toxines injectées
Tableau A-3	Valeurs des activités larves pour la brevétoxine et moyennes pour différentes doses de toxines injectées
Tableau A-4	Valeurs des activités larves pour l'acide domoïque et moyennes pour différentes doses de toxines injectées
Tableau A-5	Valeurs des activités larves pour l'acide okadaïque et moyennes pour différentes doses de toxines injectées

Liste des abréviations

A_L	Activité Larve
Ca	Calcium
CE₅₀	Concentration efficace 50
CL₅₀	Concentration Léthale 50
CLBP	Chromatographie Liquide Basse Pression
CO₂	Dioxyde de carbone
CMA	Concentration Minimale Active
Da	Dalton
ESI/MS	<i>Electrospray Ionisation / Mass Spectrometry</i>
EtOH	Ethanol
IFREMER	Institut Français de Recherche sur la Mer
MeOH	Méthanol
m/z	<i>rapport masse sur charge</i>
Na	Sodium
NH₄NO₃	Nitrate d'ammonium
SMAB	Substances Marines à Activité Biologique
SM / SM	Spectrométrie de masse en tandem
SO₄	sulfate
Tris	Tris (hydroxyméthyl)aminométhane
uma	unité de masse atomique

Introduction

L'importance du contrôle des aliments a pris un essor depuis plusieurs années. Des organismes de contrôle, comme par exemple IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) effectuent des prélèvements périodiques pour s'assurer de la qualité de ces produits.

Les produits de la mer font bien-sûr parti des aliments contrôlés car ils peuvent être, au même titre que les produits d'origine non marine, source d'intoxications.

La genèse d'une intoxication débute par la contamination du coquillage par un micro-organisme qui en se développant peut synthétiser un grand nombre de composés. Certains de ces composés peuvent s'accumuler dans les coquillages, sur lesquels ils n'ont souvent pas d'effet, et lorsque l'homme les consomme, les molécules actives agissent et provoquent des désordres aboutissant à une intoxication.

Certains épisodes de toxicité inexplicée de coquillages et d'autres de mortalité de coques ont beaucoup fait parler d'eux dans les années 80-90 sur le littoral français. Plusieurs origines ont été recherchées (les algues, polluants, bactéries) et il s'est avéré qu'aucune d'entre elles n'étaient responsable de ces épisodes. L'hypothèse d'une origine fongique a été énoncée par le groupe SMAB (Substances marines à Activité Biologique). Des prélèvements ont alors été effectués et plusieurs souches ont été identifiées, et parmi elles, le genre *Trichoderma*. Ce genre est connu pour sa capacité à produire des peptaïbols, petits peptides d'une vingtaine d'acides aminés, connus pour créer des pores dans les membranes et donc induire un désordre physiologique important.

Le travail présenté consiste à rechercher s'il peut y avoir des interactions entre les peptaïbols et certaines phycotoxines (la saxitoxine, l'acide okadaïque, l'acide domoïque, la brevétoxine et la tétrodotoxine). Pour cela une production de peptaïbols a été entreprise. Après extraction et concentration, ils ont été identifiés par spectrométrie de masse. Enfin leur activité, ainsi que celles des phycotoxines, a été étudiée par recherche de leur toxicité sur larves de diptères.

Partie 1

Trichoderma sp. - Peptaïbols

Etude bibliographique

I - Le genre Trichoderma

I-1 Taxonomie

I-1-1 Historique du genre

Le genre *Trichoderma* a été pour la première fois décrit par Persoon en 1794 comme étant « une poudre farineuse enfermée dans une couverture chevelue ». De cette observation a certainement découlé le nom du genre : *trikos*, en grec, signifiant cheveu. En 1939, Bisby a fait une étude sur la variabilité du genre et a démontré que c'était un genre monotypique et que la seule espèce le constituant était *T. viride*. Les travaux de Gutter et Monbasher (1963) ont montré la variabilité du genre et c'est en 1969 que Rifai a opté pour une classification basée sur le concept d'espèce agrégée : "une entité qui peut être définie comme des agrégations d'espèces morphologiquement très similaires et très difficilement séparables". Des réarrangements ont été ensuite effectués par Bisset et ont abouti au regroupement des espèces dans cinq sections : *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*.

D'après la classification donnée dans de nombreux ouvrages, les champignons du genre *Trichoderma* appartiennent à la classe des Hyphomycètes et sont souvent classés comme anamorphes de la famille des Hypocreaceae de la division des Ascomycètes (Esposito *et al.*, 1998).

Les Hyphomycètes sont des champignons à filaments mycéliens stériles (Agonomycétales) ou produisant leurs spores directement sur des hyphes ou sur des conidiophores simples ou agrégés (Moniliales). Les conidiophores sont des filaments différenciés portant les spores où ici les conidies permettant la multiplication asexuée du champignon.

Dans la sous-famille des Hyalosporoïdeae, à laquelle appartient le genre *Trichoderma*, les spores sont globuleuses, unicellulaires et non différenciées.

Le genre *Trichoderma* est caractérisé par ses conidiophores très ramifiés, ses phialides courtes, en forme de quille, droites ou incurvées, souvent très groupées. Une description plus précise va être faite dans un autre point de l'étude.

Il est possible de trouver une classification plus précise de l'espèce *Trichoderma koningii* dans certains ouvrages comme celui de J. Euzeby datant de 1994. La classification usuelle de *T. koningii* est la suivante :

Phylum	Deuteromycotina
Classe	Hyphomycetes
Ordre	Moniliales
Famille	Moniliaceae
Sous-famille	Hyalosporoïdeae
Tribu	Verticillieae
Genre	<i>Trichoderma</i>

I-1-2 Classification actuelle et nouvelles techniques de classification

La biologie moléculaire a un peu bouleversé la classification donnée par Bisset, elle a permis la clarification de certaines parties du genre et de différencier les différentes souches et espèces (Esposito *et al.*, 1998) mais aussi d'approfondir le découpage précédemment basé sur la morphologie (Roquebert, 1996). Une technique largement employée est celle du DNA-fingerprinting

(empreinte digitale de l'ADN). Cette technique a permis de remanier la classification de Bisset et a aboutit à une division en cinq groupes du genre *Trichoderma*.

En ce qui concerne la souche utilisée dans cette étude, la classification de Bisset place l'espèce *Trichoderma koningii* dans la section des *Trichoderma* (Esposito *et al.*, 1998) et selon la nouvelle classification, réalisée grâce à la technique du DNA-fingerprinting (empreinte digitale de l'ADN), dans le groupe IIa.

Les classifications actuelles tendent à ne plus considérer les Deuteromycètes comme groupe taxonomique. La position de *Trichoderma* devient donc difficile à placer. Il faut cependant remarquer que ce sont les anamorphes des *Hypocrea*, champignons appartenant aux Ascomycètes.

I-2 Ecologie des champignons du genre *Trichoderma*

I-2-1 Présence et distribution

Les *Trichoderma* sont ubiquitaires dans l'environnement (Samuels, 1996) et sont surtout retrouvés dans les sols forestiers. Ce sont des contaminants fréquents dans les cultures industrielles de champignons, ils peuvent également se développer sur le compost et parasiter les champignons cultivés mais aussi les sclérotés ou les propagules d'autres champignons microscopiques. Ils ont été rarement isolés de végétaux ou peu décrits comme endophytes bien qu'ils soient retrouvés à la surface des racines de certaines plantes (Papavizas, 1985). Un des substrats de choix du genre *Trichoderma* est le bois, ce qui pose notamment des problèmes de détérioration de constructions et donc entraînent des désagréments et des pertes économiques importantes.

Il est cependant possible de les rencontrer chez l'homme et plus particulièrement chez les immunodéprimés ainsi que dans les zones de stockage de papier ou les bibliothèques, posant le problème de la conservation des manuscrits (Roquebert, 1996).

Le milieu marin n'est pas en reste car des études de la microfonge des côtes du Brésil en 1996 ont montré que parmi les souches isolées, 6,4% appartenait au genre *Trichoderma* et ce genre arrivait en 4^{ème} position par ordre d'importance (De Moura Sarquis et Cunha de Oliveira, 1996). Les résultats de Claire Sallenave-Namont vont dans le même sens car, lors de l'étude de la mycoflore des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire en 1999, *Trichoderma* était retrouvé à une proportion de 10% des souches isolées et se trouvait en 2^{ème} position par ordre d'importance (Sallenave, 1999).

La répartition des champignons du genre *Trichoderma* est à peu près comparable en milieu terrestre (6% des espèces) (De Moura Sarquis M.I. et Cunha de Oliveira P., 1996) et en milieu marin (6 à 10%). Il est donc possible de soumettre l'idée que *Trichoderma* est ubiquiste et non marin stricte.

Les conditions de températures et de sols sont à l'origine de la prédominance de telle ou telle espèce dans un milieu donné. Lorsque le sol est soumis à une sécheresse intense, la population de *Trichoderma* diminue de manière importante. Les études de Danielson et Davey ont montré que certaines souches de *T. harzianum* et de *T. pseudokoningii* sont adaptées aux sols très riches en moisissures, par exemple, et que les espèces *T. viride* et *T. polysporum* sont restreintes aux zones où la température est faible alors que l'espèce *T. harzianum* est majoritairement présente dans les régions chaudes. L'espèce *T. koningii* est, par contre, retrouvé dans les régions où les conditions climatiques sont plus variables (Papavizas, 1985).

Le développement de certaines espèces de *Trichoderma* dépend également du pH du sol mais aussi de sa composition en sels, de la présence ou non de dioxyde de carbone ou de bicarbonates ainsi que de la nature et la proportion des microorganismes présents.

I-2-2 Survie dans le sol

L'abondance des champignons du genre *Trichoderma* dans le sol, ainsi que leur capacité à dégrader de nombreux métabolites ou substrats organiques et celle de résister aux autres microorganismes laisse supposer une grande aptitude à survivre dans des conditions plus ou moins difficiles. Cela dépend évidemment de l'espèce ou des souches auxquelles on s'adresse. L'exemple de l'espèce *T. harzianum* est assez frappant : si les conidies de cette espèce sont mises dans la terre sans ajout d'autres nutriments, elles sont capables de survivre entre 110 et 130 jours et d'après certaines études, les hyphes sont aussi capables de résister un certain temps dans les mêmes conditions.

Les chlamydospores survivent plus longtemps que les conidies et les études de Lewis et Papavizas ont montré que plusieurs espèces de *Trichoderma* sont capables de s'agglomérer et de former des chlamydospores indifféremment du type de sol (Papavizas, 1985).

Du fait de sa grande capacité à survivre dans divers milieu, il est aisé de penser que les espèces du genre *Trichoderma* sont également capables de survivre dans le milieu marin. Des isollements ont été réalisés à partir d'algues (genre *Rhodophyta* et *Phaeophyta*) prélevées sur la côte Atlantique et Méditerranéenne Ibérienne, à différentes profondeurs (Genilloud *et al.*, 1994).

I-2-3 Croissance *in vitro* du genre *Trichoderma*

Les *Trichoderma sp.* font parti des champignons saprophytes et utilisent principalement pour se développer : une source de carbone et une source d'azote.

Les apports de carbone peuvent avoir différentes origines : les monosaccharides, les polysaccharides, les complexes polysaccharidiques, les bases puriques et pyrimidiques, les acides aminés ainsi que les acides gras à longue chaîne.

L'azote peut être amené dans le milieu par des acides aminés, de l'urée, des nitrates et éventuellement de nitrites.

Il est aussi nécessaire de ne pas négliger l'impact que peut avoir le dioxyde de carbone et le pH du milieu. En effet, la croissance des champignons du genre *Trichoderma* devient très rapide lorsque l'on atteint un taux de CO₂ supérieurs à 10% et un milieu alcalin, ce qui explique la relative abondance de ce genre dans des habitats humides et légèrement alcalins. D'après certaines études, l'effet du CO₂ est plus prononcé à des valeurs de pH plus élevées, ce phénomène serait du aux bicarbonates (plutôt qu'au CO₂ lui-même). De ce fait certains chercheurs émettent l'hypothèse que les bicarbonates auraient un effet plus important sur la croissance que le dioxyde de carbone (Papavizas, 1985).

I-3 Morphologie des *Trichoderma sp.*

I-3-1 Sporulation

Beaucoup d'espèces de *Trichoderma* sont sensibles à la lumière et sporulent sur différents types de substrats. Ce développement s'effectue en cercles concentriques avec une alternance d'anneaux qui correspondent aux phases diurnes et nocturnes (fig P1-3). Des recherches ont montré que l'exposition pendant 20 à 30 secondes à une lumière d'intensité 85 à 90 lux était suffisante pour induire une sporulation.

Certains produits sont capables d'inhiber ou de réduire notablement la sporulation : l'azaguanine, le 5-fluorouracil, l'actinomycine D, le cycloheximide, l'alcool phénylique et le bromure d'éthidium.

Un point souvent oublié dans le phénomène de sporulation du genre *Trichoderma*, c'est la production de chlamydo-spores qui sont des spores de résistance, durables, le plus souvent à paroi épaisse, terminales (rare) ou intercalaires, différenciées par transformation de cellules ou d'articles du mycelium. Cette formation de chlamydo-spores peut être faite sur différents types de milieux : liquide ou solide, sur des extraits de sol stériles ou non et sur des débris de plantes.

I-3-2 Germination

De nombreuses recherches ont montré que la germination des conidies était dépendante d'une source externe de nutriments. La réponse des conidies aux nutriments dépend de la concentration en protons et ainsi germent mieux dans des milieux acides que neutres (Papavizas, 1985).

I-3-3 Aspects macroscopique et microscopique

Comme il a été précédemment vu, les caractères des différentes espèces de *Trichoderma* se chevauchent et rendent difficile la classification. La description qui sera effectuée ici est celle de l'espèce que nous avons utilisée dans cette étude, c'est à dire : *Trichoderma koningii* Oudemans.

I-3-3-1 Aspect Macroscopique

Il a un thalle à croissance rapide, lisse au début puis plus ou moins floconneux, souvent zoné, blanc ou vert. Ce sont les spores formées qui donnent cette couleur verte au champignon. Le revers des colonies est incolore à jaune-vert (Ragnaud J. M. *et al.*, 1984).

Chez *Trichoderma koningii*, le thalle est tout d'abord blanc puis verdâtre et par la suite vert foncé après quinze jours de mise en culture solide sur milieu de Saboureau (Botton B. *et al.*, 1990).

La couleur de la colonie est due à au pigment contenu dans les phialospores (conidies). Cette couleur peut varier du vert-noir, pour l'espèce *T. viride* par exemple, au jaune-vert clair pour l'espèce *T. koningii*. A côté de cela, la couleur des colonies est dépendantes de nombreux facteurs et varie selon. Parmi ces facteurs, on peut compter : le nombre de spores, le pH du milieu et la production de cristaux dans le milieu.



Figure P1-1 : aspect macroscopique de *Trichoderma koningii*

I-3-3-2 Aspect Microscopique

Les *Trichoderma sp.* se développent sous forme d'hyphes fongiques, ramifiés, de 5 à 10 μm de diamètre. La sporulation asexuée se fait par la formation de conidies unicellulaires (3 à 5 μm de diamètre), normalement de couleur verte et libérées en grande quantité.

Les conidiophores des *Trichoderma sp.* ont une forme conique ou pyramidale et poussent en touffes plus ou moins compactes et très ramifiées. Les verticilles sont irréguliers et les ramifications s'effectuent à angle droit.

Les phialides sont ovoïdes à ellipsoïdales, atténuées au sommet, solitaires ou en groupes et généralement perpendiculaires à l'axe.

Les conidies sont réunies en glomérules au sommet des phialides. Elles sont unicellulaires, parfois hyalines, le plus souvent vertes, lisses ou granuleuses (Botton B. *et al*, 1990) et quand elle sont jeunes, elles peuvent contenir des globules d'huiles qui disparaissent à maturité.

Les chlamydospores sont très souvent globuleuses et incolores. Elles diffèrent les unes des autres par leur taille et par leur fréquence et lieu d'apparition.

Toutes ces spécificités sont communes au genre *Trichoderma*.

Dans le cas plus spécifique de l'espèce *koningii*, les caractères sont les suivants (figure P1-2):

- des conidiophores très ramifiés
- des phialides en forme de quille souvent groupées, presque verticillées et pouvant atteindre 30µm de long
- des conidies à paroi lisse, elliptiques ou oblongues



Figure P1-2 : aspect macroscopique de *Trichoderma koningii*

I-4 Métabolites produits par les *Trichoderma sp.*

Un grand nombre d'Hyphomycètes sont capables de détériorer les denrées alimentaires provoquant ainsi la dégradation des caractères organoleptiques, mais surtout des intoxications graves pour les consommateurs. Leur activité détersive dépend de leur activité enzymatique (cellulasique...), de la nature de la substance, de l'environnement (température et humidité notamment) et des phénomènes de concurrence avec d'autres micro-organismes. Ils peuvent contaminer des céréales mais aussi des produits laitiers provoquant ainsi de nombreux accidents.

L'action détersive du genre *Trichoderma* ne se limite pas uniquement aux denrées alimentaires mais peut aussi concerner : les textiles (chanvre, coton, jute, lin, laine, soie), le liège (certaines espèces sont responsables, dans le cas du vin, du goût dit "de bouchon"), le caoutchouc, les peintures et adhésifs, les métaux (aluminium, acier...), les insecticides (organochlorés, organophosphorés) et fongicides (organomercuriques)... (Botton B. *et al*, 1990).

De ces propriétés découlent un certain nombre d'utilisation des métabolites de *Trichoderma* :

I-4-1 Utilisation dans le domaine agroalimentaire

Trichoderma produit beaucoup d'enzymes extracellulaires. Il est utilisé dans le commerce pour la production de cellulases et d'autres enzymes dégradant les complexes polysaccharidiques. L'espèce *Trichoderma reesei* est l'organisme le plus performant dans la production de cellulases (Roquebert, 1996). Les cellulases sont utilisées, par exemple, dans l'alimentation pour les oiseaux, permettant ainsi d'accroître la digestion des hemicelluloses de l'orge et d'autres céréales (Botton B. *et al*, 1990).

I-4-2 Utilisation dans le domaine de l'industrie textile et du papier

Selon le même principe, les cellulases sont utilisées lors du processus de pré-lavage des tissus pour leur donner plus facilement la couleur blanche (Botton B. *et al*, 1990).

L'espèce *Trichoderma reesei* a aussi la capacité de blanchir le papier, ce qui pourrait être une alternative aux méthodes traditionnelles utilisant le chlore (Samuels G. J., 1996).

I-4-3 Agents de bio-contrôle

Les espèces de *Trichoderma* ont reçu une attention toute particulière du fait de leur nature : ce sont des agents de biocontrôle des pathogènes fongiques des plantes (Ghisalberti E. L. *et al.*, 1991).

Ces champignons sont également utilisés pour contrôler les pathologies touchant les végétaux et plus particulièrement les mycoses. Certaines souches de *Trichoderma* sont des mycoparasites qui s'attaquent aux spores, aux myceliums ou aux sclérotés d'autres micromycètes.

Les enzymes qui seraient responsables de la dégradation des cellules de la paroi fongique sont des enzymes chitinolytiques (Samuels G. J., 1996).

L'espèce *Trichoderma harzianum* lutte, par exemple, efficacement contre la fusariose de la tomate causée par *Fusarium oxysporum* et permet d'accroître les rendements de 26% dans un sol infecté (Sivan, 1987). Elle peut aussi lutter, en association ou non avec d'autres espèces de *Trichoderma*, contre *Rhizoctonia* s'attaquant aux radis, au blé, aux graines de soja, aux fraises et aux raisins...(Samuels G. J., 1996).

Dennis et Webster (1971) ont été pu démontrer que ceratines espèces de *Trichoderma* pouvaient produire des composés volatiles et non volatiles capables

d'inhiber la croissance d'une grande variété de champignons et que la production de ces substances antifongiques variait en fonction de l'isolat. Lors de la même étude les chercheurs ont pu démontrer que tous les isolats actifs étaient associés à une forte odeur de "noix de coco". La substance responsable de cette odeur est le 6-n-penthyl-2H-pyran-2-one (6PP).

Dans le cas de l'espèce *Trichoderma koningii*, les premiers antibiotiques à avoir été isolés sont la dermadine et la trichoviridine qui sont des métabolites possédant un groupe isocyanide. La dermadine est active contre les bactéries Gram-positif et Gram-négatif et une large variété de champignon. La trichoviridine est active contre *Escherichia coli* et *Trichophyton asteroides*.

L'acide heptelidique (acide koningique) est un antifongique actif sur *Rhizoctonia solani*, sur les bactéries anaérobies comme *Bacteriodes fragilis* et a un effet cytostatique sur les cellules murines L1210. Cette propriété viendrait de sa capacité à inhiber la génération de l'ATP (Ghisalberti E. L. et al., 1991).

I-4-4 Utilisation dans le domaine médical

Des métabolites polypeptidiques ont été extraits de l'espèce *Trichoderma polysporum*, c'est le cas des ciclosporines utilisées pour leur potentiel immunosuppresseur et anti-inflammatoire mais aussi des peptaïbols ayant une activité antibiotique principalement (une partie de l'exposé sera consacrée aux peptaïbols) (Botton B. et al, 1990).

I-4-5 Potentialisation du développement des plantes

Le genre *Trichoderma* potentialise le développement de la plante et plus particulièrement celui du système racinaire. Cependant la connaissance du mécanisme d'action n'est pas certain.

Ce qui paraît certain est que les espèces colonisées par *Trichoderma harzianum* (T22) sont plus résistantes à la sécheresse. De plus il a été démontré dans une étude que les racines de maïs colonisées par T22 avaient besoin de 40% de moins de fertilisant azotés que celles non colonisées. Il est de même avec le développement des fruits d'autres plantes (Harman G. E., 1996).

I-5 Pouvoir pathogène des *Trichoderma* sp.

Bien que certaines espèces de *Trichoderma* aient un fort potentiel de lutte contre des pathologies végétales, d'autres sont responsables de pathologie animales et humaines. Certaines espèces ont été impliquées dans des cas de mycotoxicose ayant provoqué l'avortement chez les vaches. Chez l'Homme, le genre *Trichoderma* peut provoquer des infections pulmonaires, des péritonites et des cas d'hépatites chez les patients immunodéprimés dans le cas de transplantation (agent responsable : *Trichoderma koningii*) (Atlas of clinical fungi, 1995).

Des cas exceptionnels peuvent être décrits dans la littérature : en 1984, un cas de péritonite due à un *Trichoderma koningii* a été décrit (Ragnaud J. M. *et al.*, 1984). Les espèces de *Trichoderma* sont habituellement non pathogènes mais quelques cas de septicémies concomitantes à des contaminations de dextrose ont été observés. En 1995, les espèces *T. viride* et *T. longibrachiatum* ont été impliquées dans des complications de dialyse rénale et plus récemment, certaines espèces de *Trichoderma* ont été identifiées comme cause de décès de patients immunodéprimés aux Etats-Unis (Samuels G. J., 1996).

II - Les peptaïbols

Les peptaïbols sont des petits peptides linéaires produits par les champignons et caractérisés par la présence d'acide α -amino-isobutyrique qui leur confère des propriétés physico-chimiques particulières sur lesquelles nous reviendrons. Ils sont principalement produits par des champignons du genre *Trichoderma* mais également d'autres genres comme *Emericellopsis* ou *Gliocladium* par exemple. Ces peptaïbols ont pour chef de file : l'alaméthicine (figure P1-3), le premier isolé d'une souche de *Trichoderma viride* (Meyer et Reusser, 1967).

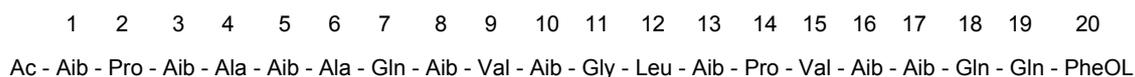


Figure P1-3 : Alaméthicine F50

(Ac = acétyl, Aib = ac α -amino-isobutyrique, Pro = proline, Ala = alanine, Gln = glutamine, Val = valine, Gly = glycine, Leu = leucine, PheOL = phenylalaninol)

II-1 Structure des peptaïbols

II-1-1 Structure primaire

Les peptaïbols sont des peptides de 15 à 20 acides aminés (Toniolo C. *et al.*, 1983). Les chercheurs ont pu montrer que ces composés étaient constitués d'acides aminés peu communs tels que : l'acide α -aminoisobutyrique (Aib, U) ou l'isovaline (Iva, J). La fréquence de ces acides aminés est importante car elle s'élève à 50%. Autre caractéristique importante : chaque molécule de peptaïbol contient au moins une proline (Sansom M.S.P., 1993).

Une autre caractéristique structurale de ces peptaïbols est le blocage des deux extrémités de la chaîne peptidique : l'extrémité N-terminale est acylée généralement par un groupement acétyl. L'extrémité C-terminale est liée à des amino-alcool tels que : le leucinol (LeuOL), le phenylalaninol (PheOL) ou encore le valinol (ValOL) (Solfrizzo M. *et al.*, 1994).

Les acides aminés chiraux et les amino alcool ont tous une configuration L avec l'exception des résidus isovaline qui ont une configuration D. On peut retrouver des résidus Iva dans les trichotoxines, les suzukacillins, les antiamebins, les emerimicins et les zervamicins (Toniolo C. *et al.*, 1983).

Rinehart avait proposé en 1977 la terminologie " peptaibophol ", Toniolo et son équipe, trouvant que cette terminologie était trop réductrice (ne prenait en compte que l' amino-alcool PheOL) ont proposé, par la suite, le nom de "peptaïbol " incluant à la fois les résidus Aib et les amino-alcool en général. Peptaïbol est, en fait, une condensation de : **peptide**, acide **α -aminoisobutyrique**, amino-alcool (Toniolo C. *et al.*, 1983).

Toutes les espèces de *Trichoderma* ne produisent pas de peptaïbols, cette propriété est fonction de la capacité de chaque espèce à produire tel ou tel acide aminé. Par exemple, le leucinol (LeuOL) n'a jamais été trouvé dans la structure des métabolites produits par l'espèce *Trichoderma viride*.

II-1-2 Structure secondaire

La structure secondaire des peptaïbols est essentiellement en hélice α ou en hélice 3_{10} . Cette conformation est stabilisée par des liaisons hydrogènes et la présence d'acides aminés α - α dialkylés (Aib), dans la séquence, réduit le degré de liberté conformationnelle du squelette peptidique. Le sens des hélices est imposé par la conformation absolue des acides aminés chiraux (Sansom M.S.P., 1993).

Le caractère amphiphile des peptaïbols joue un rôle important dans l'interaction des peptaïbols avec la membrane phospholipidique, mais aussi dans le mode d'action de ces molécules, comme nous le verrons plus loin.

II-2 Biosynthèse des peptaïbols

Les peptaïbols sont synthétisés par des complexes multienzymatiques qui sont des peptides synthétases, ce qui explique la grande diversité des peptides produits mais présuppose aussi de la complexité du mélange élaboré par les différentes souches (Brückner et Pryzbylski, 1984). De plus, du fait de la présence d'acides aminés non codés, on considère généralement que bien que les peptaïbols soient des peptides, ils sont issus du métabolisme secondaire.

Leur biosynthèse se fait par un système complètement indépendant de la synthèse protéique classique (acides nucléiques et ribosomes).

Les acides aminés (AA) constitutifs sont d'abord activés sous la forme d'aminoacyles adénylates (AAA), sous l'action d'une *amino-acyl-ARNt ligase adénylate* avec la consommation d'un ATP. Les résidus issus de cette première étape (les AAA) ont une affinité pour une autre enzyme : une *phosphate synthétase*. Cette dernière comprend 2 sites actifs, sur le premier vont se fixer les AAA par une liaison thioester. Les AAA, en présence d'ATP, vont être transférés vers le second site de la phosphate synthétase, qui contient un groupement thiol. En fin de ce transfert les AAA redeviennent des AA fixés sur l'enzyme. Le premier site de l'enzyme se trouve ainsi libéré, et peut recevoir un autre AAA, chaque AA va se lier, par des liaisons peptidiques, à l'AA arrivant, donnant naissance à la fin à un peptaïbol (Mohamed-Benkada. M. *et al*, 2003).

II-3 Classification des peptaïbols

Les peptaïbols sont répartis en trois sous-classes (Hlimi *et al.*, 1995) :

- les peptaïbols à longue séquence comportant entre 18 et 20 acides aminés avec une proline, en général, au deux tiers de la structure.
- les peptaïbols à courte séquence avec 11 à 16 résidus et plusieurs proline réparties régulièrement dans la chaîne.
- les lipopeptaïbols comprenant 7 à 11 acides aminés avec une acylation de l'extrémité N-terminale par un acide gras comme l'acide octanoïque ou l'acide décénoïque.

Peptaïbols à longue séquence :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Alaméthincines																					
F 30 I	Ac	Aib	Pro	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Val	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Glu	Gln	Pheol
F 50	Ac	Aib	Pro	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Val	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Gln	Gln	Pheol
Paracelsines																					
A	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Val	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Gln	Gln	Pheol
B	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Leu	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Gln	Gln	Pheol
C	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Ala	Aib	Gln	Aib	Val	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Gln	Gln	Pheol
D	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Ala	Aib	Gln	Aib	Leu	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Gln	Gln	Pheol
Saturnisporines																					
SA I	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Leu	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Gln	Gln	Pheol
SA II	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Leu	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Val	Aib	Iva	Gln	Gln	Pheol
Trichorzianines																					
TA IIIc	Ac	Aib	Ala	Ala	Aib	Aib	Gln	Aib	Aib	Aib	Ser	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Ileu	Gln	Gln	Trpol	
TB IIIc	Ac	Aib	Ala	Ala	Aib	Aib	Gln	Aib	Aib	Aib	Ser	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Ileu	Gln	Glu	Trpol	

Peptaïbols à courte séquence :

Zervamicines																				
ZL	Ac	Leu	Ileu	Gln	Iva	Ileu	Thr	Aib	Leu	Aib	Hyp	Gln	Aib	Hyp	Aib	Pro	Pheol			
Harzianines																				
HC III	Ac	Aib	Asn	Leu	Aib	Pro	Ser	Val	Aib	Pro	Iva	Leu	Aib	Pro	Leuol					
HC VI	Ac	Aib	Asn	Leu	Aib	Pro	Ala	Val	Aib	Pro	Aib	Leu	Aib	Pro	Leuol					
HC IX	Ac	Aib	Asn	Leu	Aib	Pro	Ala	Ileu	Aib	Pro	Iva	Leu	Aib	Pro	Leuol					

Lipopeptaïbols :

Trichogines																				
GA IV	Oc	Aib	Gly	Leu	Aib	Gly	Gly	Leu	Aib	Gly	Ileu	Leuol								
Trichodécéines																				
TD II	Dc	Gly	Gly	Leu	Aib	Gly	Leu	Leuol												

Figure P1-4 : exemples de peptaïbols appartenant aux trois classes (Solfrizzo et al., 1994 ; Bodo, 1996)

II-4 Propriétés des peptaïbols

II-4-1 Propriétés membranaires

Les peptaïbols, du fait de leur caractère amphiphile, interagissent avec les bicouches phospholipidiques des membranes cellulaires. Ils perturbent alors leurs propriétés. Les hélices amphipatiques sont orientées perpendiculairement par rapport au plan de la membrane et sont arrangées autour du pore qu'elles forment. Les chaînes hydrophiles se trouvent du côté du pore et la partie hydrophobe de ces chaînes interagit avec les chaînes d'acide gras de la bicouche lipidique. Cet assemblage est stabilisé par des interactions peptide-peptide, peptide-eau et peptide-lipide.

Il est également important de considérer le rôle que peuvent jouer les lipides de la bicouche sur la conformation que vont prendre les peptaïbols lors de leur insertion dans la membrane : suivant la nature des lipides constitutifs de cette membrane, un même peptaïbol pourra prendre deux conformations différentes (Sansom M.S.P., 1993).

A faibles concentrations, en présence de potentiel, les peptaïbols entraînent la formation de canaux voltage-dépendants. Ces canaux résulteraient de l'agrégat de plusieurs peptides (Iida *et al.*, 1994; Duval *et al.*, 1998).

A fortes concentrations, avec ou non présence de potentiel, les peptaïbols perméabilisent les membranes. Une expérience, mettant en contact les peptaïbols et une suspension de liposomes contenant un produit encapsulé, a montré que les peptaïbols ont induit la fuite du contenu intravésiculaire. La cinétique de fuite du produit dépend des caractéristiques structurales des peptides : longueur, hydrophobie et organisation spatiale des chaînes latérales.

II-4-2 Propriétés biologiques

La première activité à être étudiée fut l'activité antibiotique. De nombreuses études ont montré que l'activité antibiotique était principalement due à la formation de pores (Beven *et al.*, 1999), c'est le modèle dit : "barrel stave". Ce modèle a été approuvé de manière consensuelle et explique que la formation des pores conducteurs est due à l'agrégation de monomères, de la même manière que l'on peut assembler les douves d'un tonneau.

Selon le modèle de Iida, les peptides, grâce à ces propriétés, entraînent alors, *in vivo*, un influx d'ions Ca^{2+} . Cela entraîne, sur le plan physiologique, la sécrétion de catécholamines par les cellules chromaffines adrénaliennes. Les peptaïbols entraînent donc vraisemblablement la formation de canaux calcium artificiels induisant la libération des catécholamines (Iida *et al.*, 1994).

Les études menées par Tachikawa et son équipe en 1991 ont montré que l'incubation de cellules chromaffines avec de la trichosporine B-III provoquait une sécrétion de catécholamines et que cette sécrétion était dépendante du calcium extracellulaire aux faibles concentrations de trichosporine B-III et indépendante du calcium aux fortes concentrations. Tachikawa a pu mettre en évidence, au terme de ses recherches, que la trichosporine B-III provoquait la sécrétion des catécholamines par les cellules chromaffines adrénaliennes bovines par deux mécanismes : un dépendant du calcium extracellulaire et un autre indépendant. Pour celui dépendant du calcium, ce type de peptaïbol agit de deux façons différentes : en activant les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants endogènes ou en formant lui-même des canaux dans la membrane plasmique induisant, par conséquent un influx de Ca^{2+} dans la cellule (Tachikawa E. *et al.*, 1991; Nagaoka Y. *et al.*, 1995).

L'activité antibiotique n'est pas la seule propriété des peptaïbols car divers types cellulaires peuvent être inhibés par les peptaïbols, c'est le cas notamment des lymphocytes et des érythrocytes qui, à leur contact, sont lysés. La paracelsine, par exemple, est active contre les bactéries gram-positif mais cause aussi l'hémolyse des érythrocytes à une concentration de : $C_{50} = 3,7 \times 10^{-5}M$ et provoque une intoxication aiguë chez la souris, quand elle est administrée en intrapéritonéale, avec une dose létale d'approximativement 5 mg/kg (Solfrizzo M. *et al.*, 1994). D'autres peptaïbols, comme l'alamethicine F-50, peuvent causer le même type de désagrément (Irmischer G. et Jung G., 1977).

Partie 2

Production et toxicité des peptaïbols

Matériel et méthodes

I - Obtention des peptaïbols

I-1 La Souche utilisée

La souche **LCP 9864209** est un *Trichoderma koningii* Oudemans qui provient d'un prélèvement de coques réalisé, en novembre 1994, dans le grand Traict au Croisic (44). Le tableau P2-1 représente les différentes caractéristiques de cette souche.

Référence locale	65-S27-7
Dépôt de collection	LCP 9864209 au MNHN
Identification	<i>Trichoderma koningii</i> Oudemans par Dr MF Roquebert MNHN, Paris
Lieu de prélèvement	Le Croisic (Loire Atlantique)
Date de prélèvement	11-nov-94
Origine	Prélèvement n°65 de coques (<i>Cerastoderma edule</i>)
Partie utilisée	Broyat de chairs
Isolement	Milieu Sabouraud/Chloramphénicol/Eau de mer à 27°C pH 8,1
Toxicité	Forte activité sur larves de Diptères CL ₅₀ = 42,2% sur <i>Artemia salina</i> * CMA = 2,5 mg/mL sur test d'hémolyse
Conservation	à 4°C et sous huile de paraffine

Tableau P2 -1 : La souche de *Trichoderma koningii* Oudemans étudiée

* : CL₅₀ exprimée en pourcentage de filtrat de culture de champignons entraînant une mortalité de 50%

I-2 Culture fongique

La souche de *Trichoderma* utilisée ici a été sélectionnée du fait de sa capacité à produire des toxines. L'étape de mise en culture de champignon va servir ici à produire ces toxines. Cependant cette phase de culture est longue et se déroule en deux temps.

Tout d'abord : la culture en milieu solide afin de produire une quantité de spores suffisante pour atteindre la concentration de 5 millions de spores par mL nécessaire pour l'étape suivante qui est la culture en milieu liquide et au cours de laquelle les peptaïbols vont être produits.

L'ensemble des étapes suivantes sont réalisées dans des conditions d'asepsie afin d'éviter, au maximum, la propagation des spores dans d'autres parties du laboratoire et inversement : la contamination accidentelle, par des polluants du laboratoire, de la souche sous la hotte.

I-2-1 Cultures en milieu solide

Cette étape est primordiale pour produire le maximum de spores qui seront ensuiteensemencées dans le milieu liquide. Le champignon va nécessiter 21 jours d'incubation à 27°C pour produire le maximum de spores.

La culture solide commence par un repiquage à partir de la souche conservée en mycothèque.

Le milieu solide utilisé dérive du milieu de Sabouraud où l'eau distillée est remplacée par de l'eau de mer stérile. L'eau de mer provient du Croisic, sa concentration en chlorure de sodium est de 3%. Avant d'être utilisée, l'eau de mer est préalablement stérilisée à l'autoclave pendant 20 min à une température de 110°C, et à une pression de 1 bar.

La composition du milieu Sabouraud, pour un litre, est la suivante :

- peptone peptique de viande : 10g
- glucose : 35g
- agar agar bactériologique : 15g

Une suspension de 65g de poudre déshydratée est effectuée dans un litre d'eau salée (6 litres sont ici préparés), puis la solution obtenue est placée dans l'autoclave pour être stérilisée, ceci pendant 20 minutes à 1 bar de surpression. La solution bouillante est ensuite coulée directement dans vingt-deux fioles de Roux (235 mL par fiole de 1200 mL), et par refroidissement, un gel sera obtenu.

L'ensemencement est ensuite réalisé par dépôts successifs sur la gélose de spores prélevées sur une culture de la souche au moyen d'une pipette Pasteur. Les fioles de Roux sont mises à incuber à 27°C pendant 21 jours pour obtenir un envahissement total de la surface.

I-2-2 Cultures en milieu liquide

Le milieu liquide correspond à l'étape au cours de laquelle les peptaïbols vont être synthétisés par la souche et ceci après récupération et concentration des spores produites lors de l'étape précédente.

I-2-2-1 Préparation de la suspension mère

Le but de cette étape est de récupérer le maximum de spores, résultant du développement de la souche sur milieu solide, de manière à avoir une forte concentration, de cette suspension mère, en spores dans l'eau de mer stérile.

Pour réaliser le décrochement des spores, une pipette Pasteur est incurvée et introduite à l'intérieur de la fiole de Roux. Le grattage est réalisé par plusieurs mouvements de va-et-vient à la surface du champignon.

Afin de ne pas récupérer de gros fragments de milieu et de champignons, il est nécessaire d'effectuer une filtration au moyen d'une gaze stérile.

I-2-2-2 Comptage, ensemencement du milieu liquide et culture

Avant de procéder à la mise en culture en milieu liquide proprement dite, un comptage des spores présentes dans la solution mère doit être réalisée sur hématimètre de Malassez. Ce comptage est indispensable car pour obtenir une croissance optimale du champignon en milieu liquide et pour assurer une concentration constante, la concentration de départ doit être de 5 millions de spores par mL.

Le milieu de fermentation utilisé est un milieu de référence recommandé pour la culture des champignons marins (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979).

Sa composition est la suivante :

- Glucose :	10g
- Sulfate de magnésium ($MgSO_4, 7H_2O$) :	2,4g
- Nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) :	2,4g
- Extrait de tampon Tris (pH = 7.5) :	1,21g
- Eau de mer stérile :	1 L

Le glucose est la source de carbone, le nitrate d'ammonium est la source d'azote.

Le tampon Tris est du tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane.

Chacun des constituants est exactement pesé puis placé dans des flacons de 0,5 L contenant 300 mL d'eau de mer. Une trentaine de flacons sont préparés.

Le pH du milieu est alors de $8,3 \pm 0,2$. Afin que la souche de *Trichoderma* se développe de manière optimale, une acidification du milieu est requise : le pH doit être descendu à $6,3 \pm 0,2$ par addition d'une solution d'acide chlorhydrique à 1N. Une fois le milieu préparé, les flacons sont soumis à la stérilisation dans l'autoclave à une pression de 0,4 bar et à 110°C afin d'éviter la réaction de Maillard.

L'ensemencement est réalisé à partir de la suspension mère. Le volume ajouté dans chaque flacon doit être suffisant pour obtenir la concentration finale et optimale de 5 millions de spores par mL. Les flacons sont ensuite placés à 27°C sans agitation et à la lumière naturelle pendant 28 jours, durée optimale de production des peptaïbols (Landreau A. *et al.*, 2002).

I-3 Extraction et purification des peptaïbols

Après 28 jours d'incubation en milieu liquide, les 18 litres de milieu sont rassemblés et subissent plusieurs étapes de filtrations successives : tout d'abord une filtration « grossière », qui s'effectue sous vide et sur un filtre fritté recouvert de poudre de célite, puis s'en suit une filtration « stérilisante » sur un filtre de porosité 0,45 µm.

Cette étape est indispensable car elle permet de récupérer les métabolites excrétés par le champignon, en les séparant des parties solides (spores, mycélium...). Il ne reste alors dans le milieu que les métabolites excrétés par le champignon.

I-3-1 Extraction du milieu de fermentation

Les extractions des métabolites secondaires excrétés par le champignon dans le milieu de culture sont de type liquide – liquide. Les solvants utilisés sont l'hexane puis le dichlorométhane qui sont des solvants de polarité croissantes permettant l'extraction des peptaïbols. Les 18 litres de jus de filtration sont extraits par fraction de 300 mL avec 200 mL de chaque solvant et ceci par trois fois.

Le protocole d'extraction est décrit dans la figure P2-1. L'hexane est utilisé pour éliminer les substances les moins polaires non actives, les peptaïbols passant ensuite dans le dichlorométhane qui est ensuite déshydraté sur du sulfate de sodium. La solution sera ensuite filtrée puis soumise à une évaporation à sec.

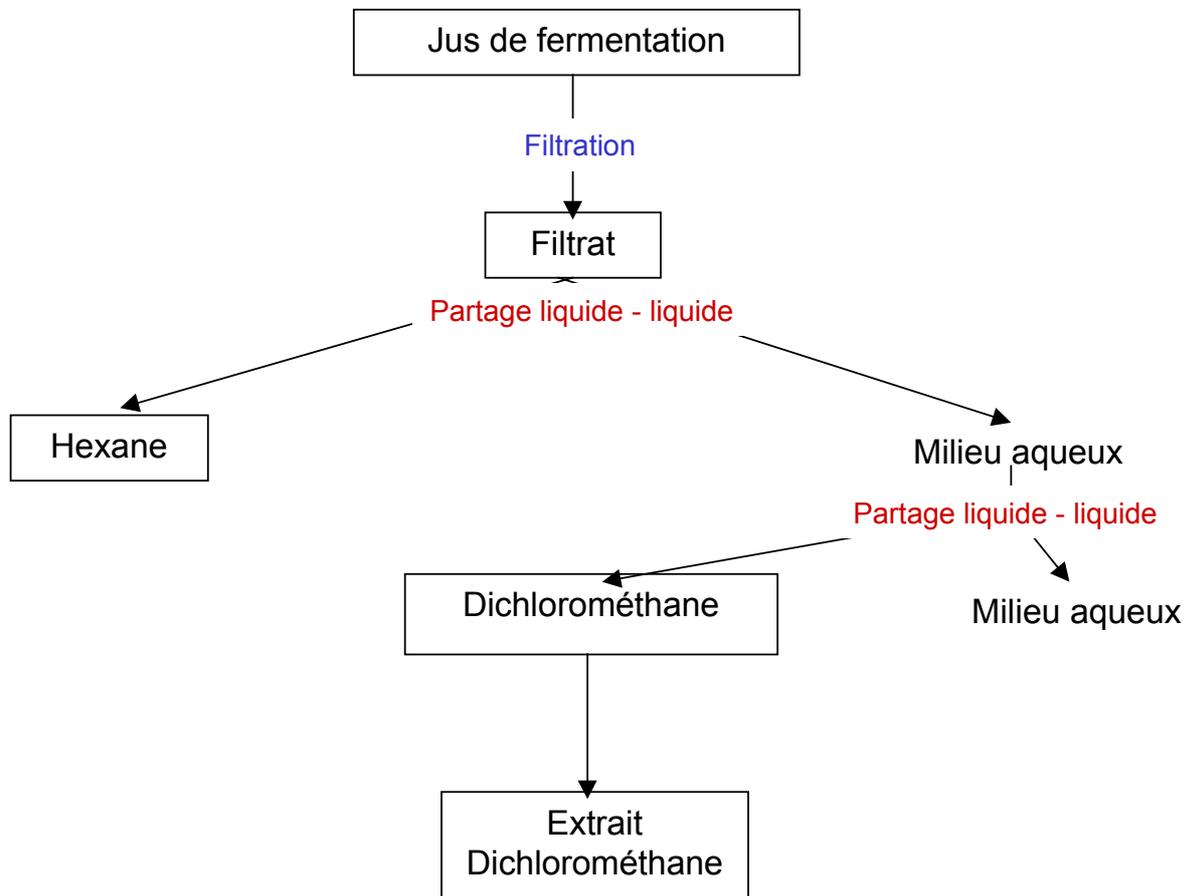


Figure P2-1 : protocole d'extraction des milieux liquides

I-3-2 Le fractionnement chromatographique

Le but de cette technique est de concentrer les peptaïbols contenus dans l'extrait chlorométhylénique. Les travaux de Landreau (Landreau A., 2001) ont abouti à la conclusion que la meilleure technique de fractionnement était la chromatographie base pression (CLBP) et que les colonnes à utiliser préférentiellement sont de type silice greffée diol. L'éluant utilisé ici est un mélange dichlorométhane / éthanol à divers pourcentages.

Une colonne de phase " diol " est alors réalisée : 15 g de phase (Nucleoprep 100-30 OH, Mecherey-Nagel, Düren) sont pesés, mis dans du dichlorométhane puis placés dans une colonne de 2 cm de diamètre et de 14 cm de long. Pour conserver l'homogénéité de la colonne, la phase est tassée au fur et à mesure qu'elle est versée dans la colonne. L'excès de solvant est éliminé par aspiration par le bas de la colonne.

Une fois la colonne préparée, l'extrait, obtenu à la suite de la phase d'extraction, est repris dans un peu de dichlorométhane et est versé de manière homogène et lentement à la surface de la colonne.

Dans le même temps, on prépare les différents mélanges éluants. La composition est toujours la même : dichlorométhane – éthanol mais à des concentrations d'éthanol variables. 200 mL de mélange à 0, 1, 2, 5, 10 % d'éthanol sont préparées.

Ces différents éluants sont passés successivement sur la colonne. La fraction obtenue par passage du mélange 90/10 est évaporée et pesée, c'est la fraction qui contient les peptaïbols.

II Analyse des peptaïbols obtenus

II-1 Principe de la méthode

L'objectif de cette analyse a été de mettre en évidence et d'identifier les peptaïbols présents dans le mélange obtenu.

La technique de spectrométrie de masse employée ici est la spectrométrie ESI-MS / IT (electrospray - spectrométrie de masse / trappe d'ion).

L'électrospray induit la formation, à température et à pression ambiantes, d'un nébulisat à partir de la solution à analyser grâce à un champ électrique de 4 à 5 kV.

Dans la trappe d'ions, l'ion déterminé (appelé ion parent) est piégé et sous l'influence d'un courant appliqué, il se charge en énergie et se fragmente en ions fils. La perte de masse entre l'ion parent et l'ion fils est caractéristique d'un groupement chimique et permet lors d'un séquençage de remonter à la structure complète de la molécule. L'obtention d'ions fils par fragmentations successives (SM^n) est spécifique d'un seul et même composé et permet donc de l'identifier.

Les spectres obtenus vont être ensuite analysés. Les pics de ces spectres sont représentatifs de l'abondance isotopique de la molécule. Chaque massif isotopique est caractérisé par une intensité relative. Au pic le plus important correspond la valeur 100%. Ceci permet de donner une idée sur la proportion relative de chaque composé dans l'échantillon.

II-2 Analyse qualitative : détection des peptaïbols

La mise en évidence des peptaïbols, qui apparaissent sous forme d'adduits sodium en milieu neutre, est effectuée par recherche en mode d'acquisition haute définition (zoomscan) avec un balayage sur la zone de 600 à 1200 m/z pour l'exploration des bichargés ($[M+2Na]^{2+}$) et des trichargés ($[M+3Na]^{3+}$) et sur une zone d'acquisition de 1850 à 2000 m/z pour l'exploration des monochargés ($[M+Na]^+$).

Les peptaïbols sont facilement repérables car ces petits peptides ont un profil d'abondance isotopique caractéristique donné par la figure P2-2.

Cette étude a été complétée par l'exploration en mode négatif d'une zone allant de 1920 à 2000 m/z, ceci avec dans tous les cas un pas de 9 unités m/z.

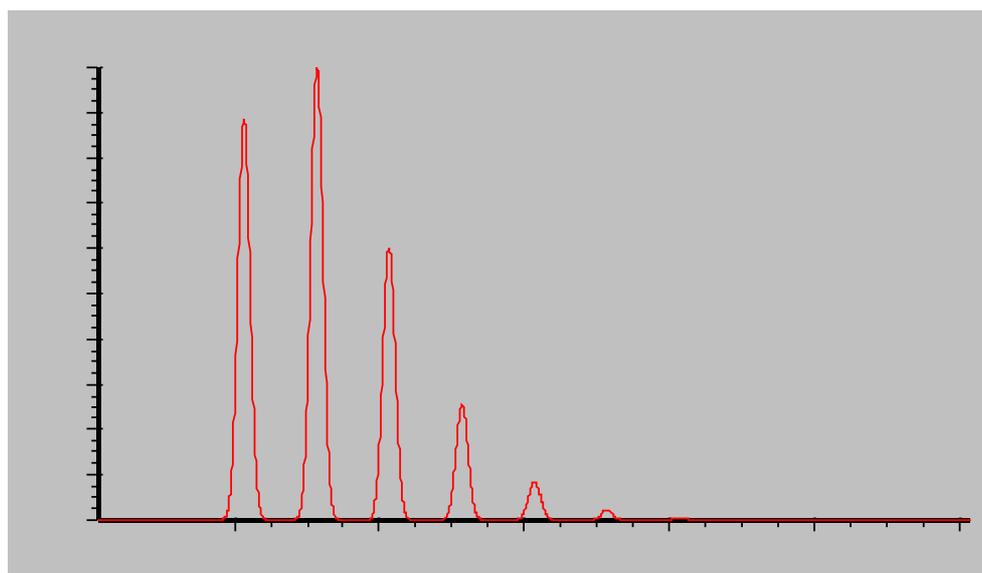


Figure P2-2 : profil d'abondance isotopique théorique calculé avec le logiciel IsoPro 3.0 pour une formule brute $C_{91}H_{151}N_{23}O_{24}$ (alaméthicine F50)

Lorsque un massif isotopique est intéressant et correspond à un peptaïbol, l'isotope le plus abondant est sélectionné et placé dans une zone libre de champ (trappe d'ion) où se trouve la cellule de fragmentation. L'ion est donc fragmenté et l'étude de son spectre MS/MS permet la confirmation de la présence ou non d'un peptaïbol dans l'échantillon (figure P2-3).

Par fragmentation de l'ion bichargé, les peptaïbols se scindent classiquement en deux parties entre la proline et l'acide α -aminoisobutyrique. Ces deux fragments sont appelés : fragment C-terminal et fragment N-terminal et sont représentés par des pics d'intensité importante sur le spectre.

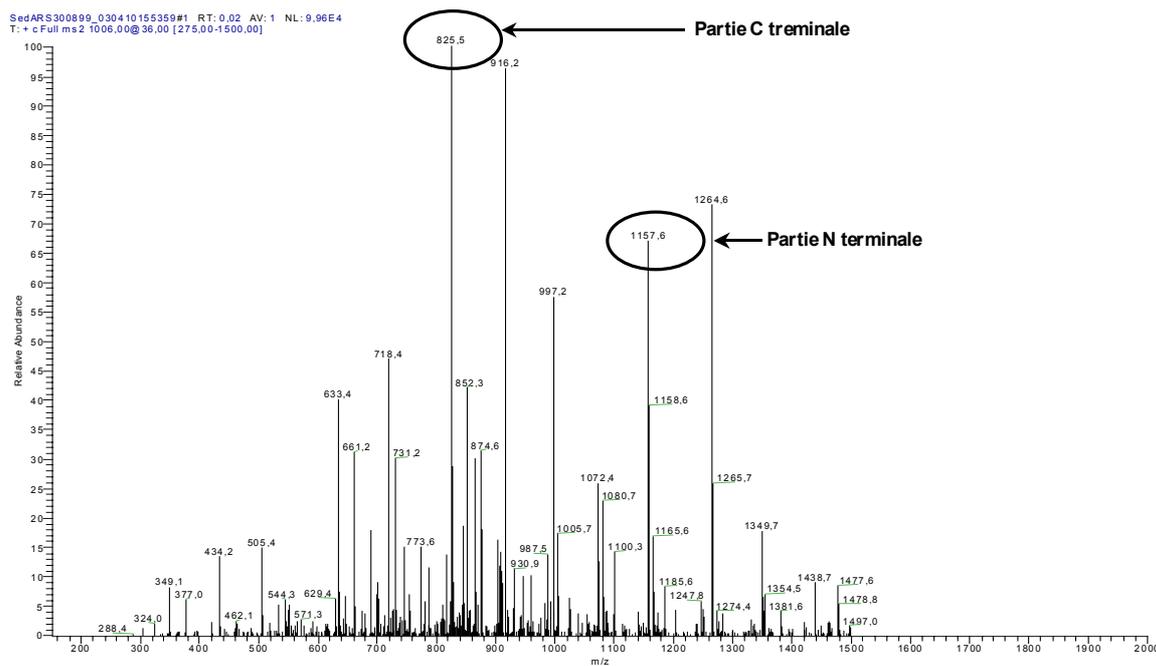


Figure P2-3 : spectre MS² d'un peptaïbol d'une masse de 1966 Da

II-3 Analyse semi-quantitative relative du mélange de peptaïbols

L'analyse quantitative des peptaïbols présents n'est pas possible du fait du manque de témoins purifiés. Par contre, les peptaïbols étant des molécules chimiquement très voisines, on peut penser que leurs ionisations dans le spectromètre de masse sont relativement identiques pour toutes. Il sera donc possible de faire une détermination semi-quantitative relative de la composition du mélange de peptaïbols obtenu, en comparant les intensités absolues des pics correspondants.

III Etude de l'activité sur larves de Diptères

III-1 Réalisation pratique du test

L'objectif du test « larve » est de déterminer la concentration efficace 50 (CE₅₀) qui est la concentration à laquelle l'activité équivaut à la moitié de l'activité maximale qu'il est possible d'obtenir avec cette toxine.

Le déroulement de ce test suit la méthode décrite par Zlotkin (1971) pour les protéines de venin de scorpion. Les larves utilisées appartiennent à l'espèce *Phormia terrae novae* (Cycloraphes).

La solution est injectée à raison de 0,1 µL par mg de poids de larve. Sachant que le poids moyen d'une larve est, la plupart du temps, proche de 70 mg : 7 µL de solution seront injectés.

L'injection est réalisée à l'aide d'une microseringue de précision de 10 µL, munie d'une aiguille hypodermique très fine, au niveau de la partie postérieure de la larve. L'aiguille doit pénétrer jusqu'au tiers du corps de la larve. Une fois que l'injection est terminée, le chronomètre est déclenché et on note le temps T au bout duquel la larve s'immobilise.

L'immobilisation est considérée comme immédiate si elle intervient dans un délai inférieur ou égal à 5 secondes (Zlotkin *et al.*, 1971). Le test est considéré comme négatif si T est supérieur à 660 secondes.

III-2 Détermination de la Concentration efficace 50 (CE₅₀)

III-2-1 Recherche des limites d'activité

L'échantillon à tester est solubilisé dans du DMSO à 20% et du méthanol à 10% dans l'eau. A ces concentrations, les solvants ne sont pas toxiques pour les larves. Pour le vérifier, à chaque concentration testée, trois larves témoins sont traitées par le solvant seul.

La quantité de solvant à ajouter au mélange de peptaïbols doit être suffisante pour avoir une concentration de départ de 100 µg/µL pour les extraits chlorométhyléniques et à des concentrations variables pour les toxines pures témoins (tableau P2-2).

Tableau P2-2 : toxines pures et concentration des solutions mères

Toxine	Concentration (ng/µL)
Saxitoxine	10
Térodotoxine	0,2
Brévétoxine	1 000
Ac. Domoïque	250
Ac Okadaïque	50

Une gamme de dilutions successives est réalisée à partir de la solution mère obtenue auparavant.

Chaque dilution est testée sur 3 larves et on note le temps T au bout duquel la larve s'immobilise totalement. Une fourchette d'activité est déterminée avec :

- une **concentration limite supérieure** correspondant à la concentration pour laquelle les larves s'immobilisent totalement.

- une **concentration limite inférieure** correspondant à la concentration pour laquelle les larves ne s'immobilisent plus.

Un exemple est donné par le tableau suivant :

Tableau P2-3 : Exemple de recherche des limites d'activité d'une toxine

Concentration des solutions pg/ μ L	1	10	100	1 000	10 000	100 000
Quantité injectée correspondante pg/mg	0,1	1	10	100	1 000	10 000
Symptômes	-	-	-	Immobilisation retardée	Immobilisation immédiate	Immobilisation immédiate
Activité AL	0	0	0	20	100	100



Concentration
limite inférieure



Concentration
limite
supérieure

Une fois ces concentrations déterminées, une gamme de concentrations intermédiaires est testée afin d'établir la courbe dose / activité (figure P2-4).

L'activité larve est ensuite calculée grâce à la formule : $A_L = 500 / T$.

III-2-2 établissement de la courbe d'activité et détermination de la CE_{50}

Suite aux calculs d'activité, on trace la courbe semi-logarithmique $AL = f(\text{Dose})$ pour chacun des points. Elle permet de déterminer la CE_{50} ou concentration efficace 50.

Exemple de représentation graphique des activités larves en fonction des doses injectées :

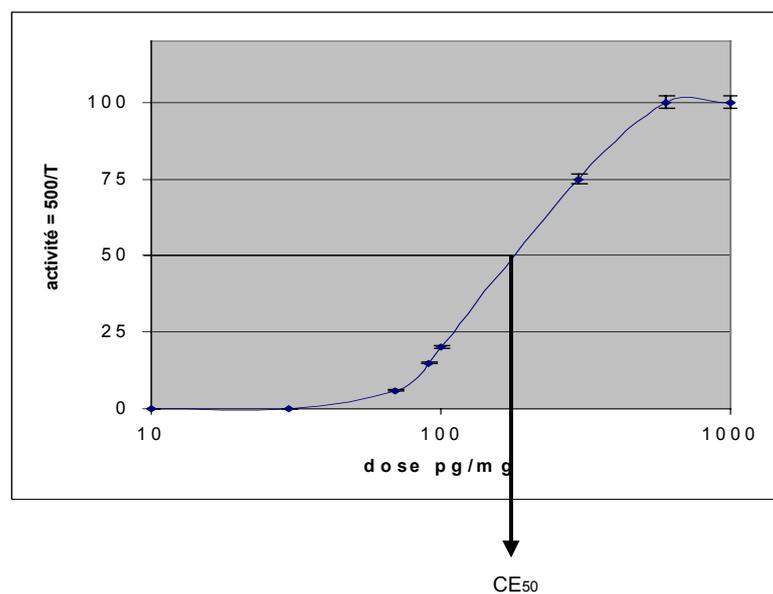


Figure P2-4 : représentation graphique des activités larves en fonction des doses injectées – détermination de la CE_{50}

Partie 3

Production et toxicité des peptaïbols

Résultats et discussion

I Production des peptaïbols

La figure P3-1 reprend toutes les étapes relatives à la production de la souche de *Trichoderma koningii*. Elle rassemble les deux séries de manipulations effectuées afin d'obtenir des peptaïbols. La masse de l'extrait représentée ici est donc la somme des masses obtenues suite au traitement des deux jus de fermentation.

Il n'est fait mention, ici, que de la fraction à 10% d'éthanol (fraction résultant de la chromatographie basse pression).

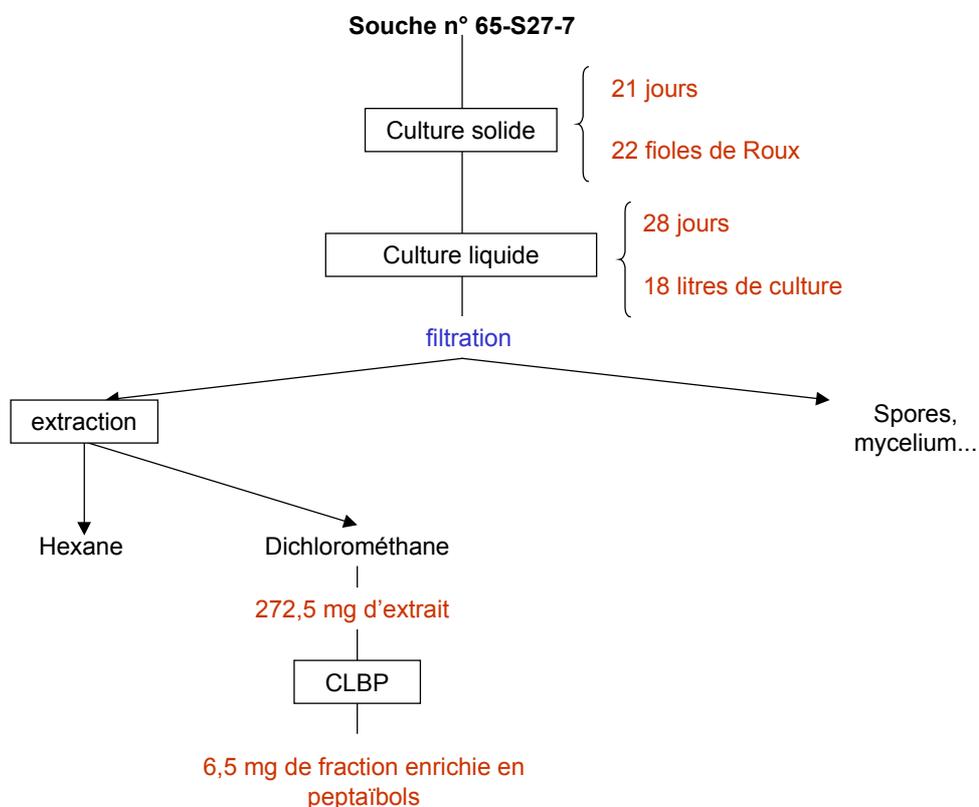


Figure P3-1 : synopsis de la production et de l'isolement des peptaïbols

La masse totale de l'extrait chlorométhylénique est de 275 mg et la masse de la fraction 10 % d'éthanol, fraction active, résultant de la CLBP, est de 6,5 mg. Le rendement est donc de : 0,36 mg/ L de culture liquide.

II Analyses des peptaïbols par spectrométrie de masse

II-1 Analyse qualitative

L'analyse qualitative de l'échantillon a été effectuée par spectrométrie de masse. Plusieurs pics majoritaires ont été repérés lors de l'analyse du spectre en "fullscan", tels que 991,2 ; 998,2 ; 1005,5 m/z ou encore : 1959 et 1974 m/z (figure P3-2).

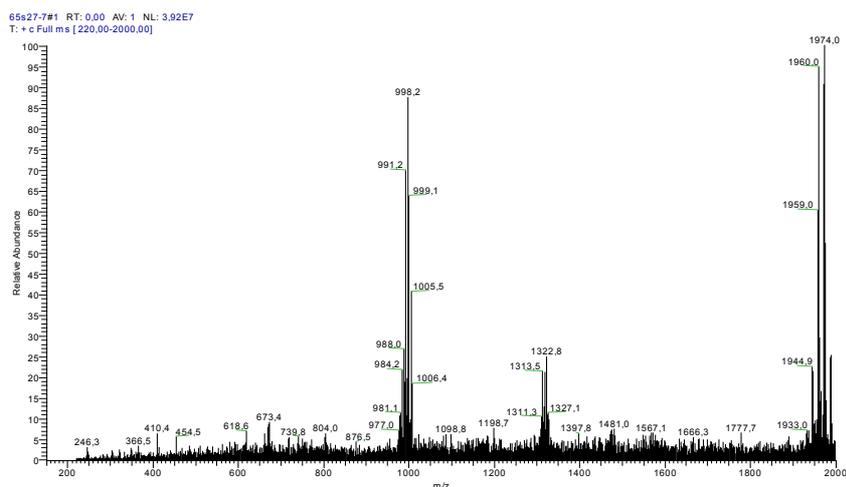


Figure P3-2 : fullscan de l'échantillon produit par la souche

L'analyse du spectre en zoomscan, dans la zone d'acquisition allant de 600 à 1200 m/z en mode positif, a permis de mettre en évidence la présence de 9 massifs isotopiques bichargés représentés dans le tableau P3-1 et d'un massif isotopique trichargé. Les zones riches en monochargés, zone allant de 1850 à 2000 m/z en mode positif et de 1920 à 2000 m/z en mode négatif, ont été également étudiées.

Des correspondances entre les différents types de charges pour un même ion ont pu être observées et sont retrouvées dans le tableau P3-1.

Tableau P3-1 : énumération des pics représentatifs observés aux différentes m/z et comparaison

[M + 2 Na]²⁺ (m/z)	[M + 3Na]³⁺ (m/z)	[M+Na]⁺ (m/z)	[M-H]⁻ (m/z)	[M] Masse molaire (Da)
956	645	1889	1865	1866
974,5	657	1926	1902	1903
977,6	659	1932	1908	1909
984	663,7	1945	1922	1922
988	667	1953	1929	1930
991	668	1959	1935	1936
998,5	673	1974	1950	1951
1002,5	676	1982	1958	1959
1005,1	678	1987,2	1963,3	1964,2

En gris = pics observés, en blanc= valeurs calculées

Ces résultats montrent la présence d'au moins 9 peptaïbols différents. Seul le séquençage, obtenu grâce à la fragmentation de ces ions, permettra de confirmer cette hypothèse.

Les massifs sont identifiés par leurs profils d'abondance isotopique comme le montre la figure P3-3 pour l'exemple de l'ion 1005,1.

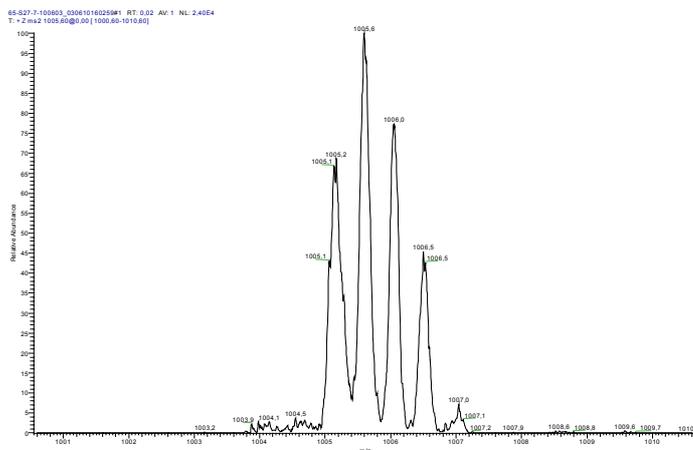


Figure P3-3 : zoomscan du massif monoisotopique à 1005,1 m/z

Du fait du grand nombre de peptaïbols présents et du manque de temps lors de cette étude, nous n'avons pas pu identifier chacun des pics du tableau précédent. Néanmoins, à titre d'exemple, nous avons essayé d'aller plus loin dans l'identification d'un de ces pics : le 1005,1 qui correspond à une masse de 1964,2 Da. Ce pic a d'abord été observé en zoomscan et a présenté la forme caractéristique des massifs isotopiques observés lors de l'étude d'un peptide (figure P3-3)

L'ion à 1005,1 a été ensuite piégé dans la trappe d'ion et fragmenté en ions fils avec des déplacements différents (figure P3-4). A l'observation du spectre, on a pu mettre en évidence la présence de deux parties : N et C terminales, résultant de la fragmentation de l'ion parent, mais aussi la présence d'acide aminés comme l'Aib, caractéristique des peptaïbols. La distance entre les pics 1171,6 et 1086,6 m/z correspond à l'Aib (acide α -aminoisobutyrique) du fragment N-terminal et c'est à cet endroit que s'effectue la fragmentation.

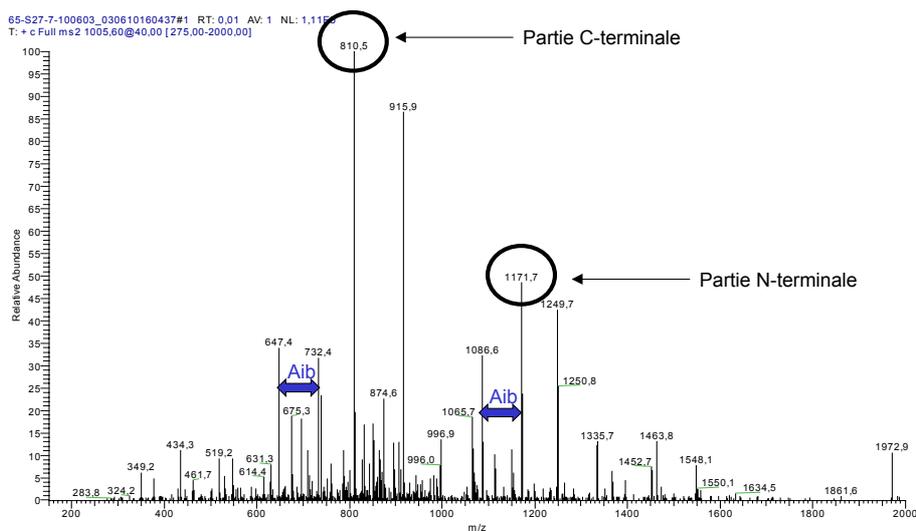
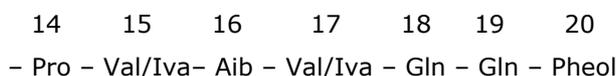


Figure P3-4 : MS² de l'ion m/z 1005,1 (énergie de collision 40%, fenêtre 3)

Suite à ces résultats, la MS³ de l'ion m/z 810,5, avec une énergie de fragmentation de 40% et une fenêtre de 3 uma, a été réalisée et a permis de débiter le séquençage de la partie C-terminale du peptaïbol. En partant de l'extrémité C terminale, on trouve un phénylalaninol (m/z 810-660 = 150) ; une glutamine (m/z 660-532 = 128) ; une 2^{ème} glutamine (m/z 532-404 = 128) ; une valine ou une isovaline (m/z 404-305 = 99) ; un acide α-aminoisobutyrique (m/z 305-220 = 85) ; une valine ou une isovaline (m/z 220-121 = 99) et enfin la proline (m/z 121-24 = 97) qui termine la séquence du fragment C-terminal puisque la fragmentation s'effectue à ce niveau. La figure P3-5 reprend sous forme de schéma la séquence précédemment énoncée.



**Figure P3-5: séquence de la partie C-terminale du peptaïbol
au déplacement m/z 1005,1**

Afin de préciser les recherches et dans un souci de rapidité, la séquence trouvée a été proposée à une base de données (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaïbol/home.shtml>) sur les peptaïbols et par

élimination des masses molaires ne correspondant pas dans ce cas, cinq peptaïbols ont été retenus : la longhibrachin A IV, la trichocellin TC-A-VI, la trichocellin TC-A-VIII, la trichosporin TS-B-IVb et la trichosporin TS-B-Vib.

Seules, la fragmentation de la partie N-terminale ainsi que son séquençage, pourront permettre la détermination précise de la nature du peptaïbol ici recherché.

II-2 Analyse semi-quantitative

Cette analyse permet de donner une idée sur la proportion de chaque peptaïbol, les uns par rapport aux autres, dans l'échantillon (tableau P3-2).

Tableau P3-2 : Proportion hypothétique de chaque peptaïbol

[M+2Na+]	Valeur du signal correspondant à 100%	Pourcentage par rapport au signal total des ions correspondants aux peptaïbols
956	7,66E+04	2
974,5	3,10E+04	1
977,6	1,39E+05	4
984	4,89E+05	13
988	9,12E+05	23
991	1,47E+06	38
998,5	2,57E+05	7
1002,5	8,74E+04	2
1005,1	4,34E+05	11
		100

III Etudes de toxicité sur larves de Diptères

III-1 Pourquoi le test larve ?

Longtemps le test de toxicité sur souris a été le seul utilisé pour tester le potentiel neurotoxique d'une toxine. Un certain nombre d'inconvénients (trop coûteux, trop grande quantité de produit nécessaire et mauvaise appréciation des résultats observés) a poussé les chercheurs à trouver une alternative à ce test. C'est alors que des chercheurs travaillant sur les toxines de scorpions ont mis au point un test sur larves afin de mettre en évidence l'effet neurotoxique de certains composés de ce type de venin (Eitan *et al.*, 1990). Grâce à ce test, les équipes de chercheurs ont pu classer les différentes neurotoxines contenues dans le venin de scorpion en grands groupes : celles provoquant une paralysie immédiate et rapide par contracture généralisée et celles induisant une paralysie lente, progressive, flasque avec une relaxation complète de tous les muscles du corps.

Les peptaïbols donnent sur ce test, qui a permis leur mise en évidence dans les souches marines, une réponse positive (Landreau *et al.*, 2002). Afin de savoir si d'autres toxines marines répondaient positivement à cette technique, nous avons, dans un premier temps, testé une série de phycotoxines.

III-2 Intérêt du test : détermination de la CE₅₀ de différentes phycotoxines

Le but de cette étude est de savoir si le test larve était spécifique des neurotoxines. C'est pourquoi nous avons utilisés, ici, différentes phycotoxines comme : la saxitoxine, la tétrodotoxine, l'acide domoïque et la brevététoxine qui sont neurotoxiques et l'acide okadaïque qui est une toxine diarrhéique non neurotoxique.

Chaque toxine a donc été testée, les courbes obtenues sont regroupées sur la figure P3-6 (les tableaux de valeurs obtenues pour chacune des toxines sont référencés dans les annexes) et le tableau P3-3 récapitule les valeurs de CE₅₀ obtenues pour chacune des toxines.

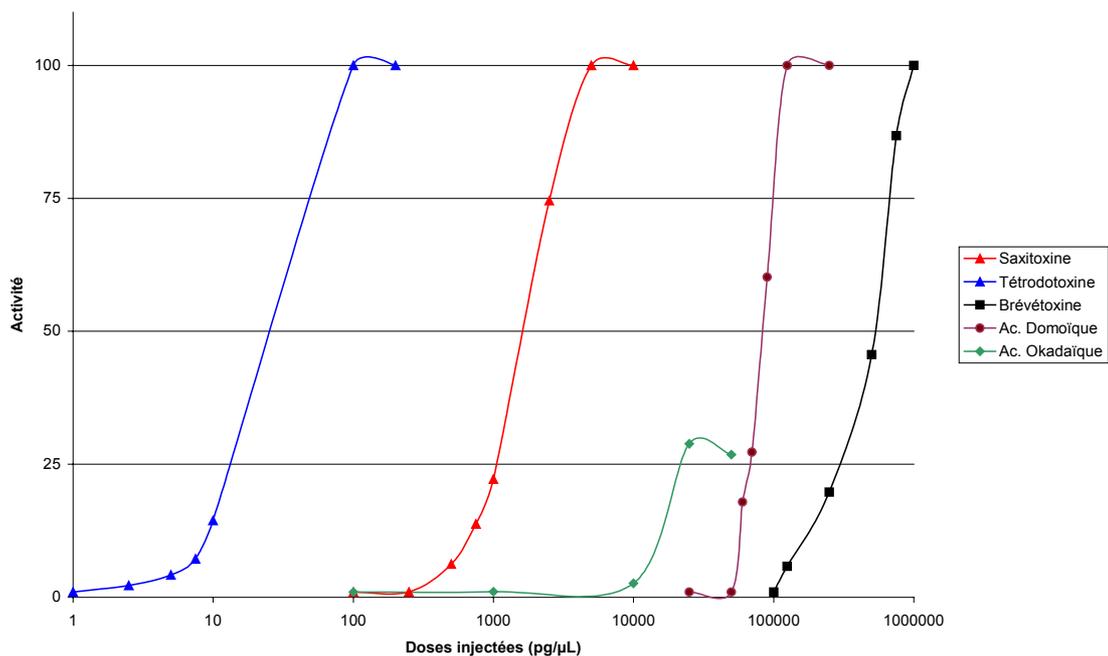


Figure P3-6 : représentation des courbes d'activité des phycotoxines étudiées

Tableau P3-3 : tableau récapitulatif des valeurs obtenues lors du " test larve " avec certaines phycotoxines

Phycotoxine	CE ₅₀	Activité maximale	Mode d'action	
			Neurotoxine	Cible
Tétrotoxine	26 pg/μL	100	oui	Blocage de canaux Na ⁺
Saxitoxine	1,8 ng/μL	100	oui	Blocage de canaux Na ⁺
Acide okadaïque	23 ng/μL	30	non	Inhibiteur enzymatique*
Acide domoïque	85 ng/μL	100	oui	Agoniste glutamate
Brévéttoxine	0,67 μg/μL	100	oui	Activateur canaux Na ⁺

* Inhibiteur des protéines phosphatases

Il est important de souligner que seul l'acide okadaïque, qui n'est pas une neurotoxine, a une activité maximale de 30 alors que les neurotoxines en ont une de 100. Ces résultats montrent bien la spécificité du test : le test sur larves de diptères est donc bien spécifique des neurotoxines.

III-3 Détermination de la CE_{50} des peptaïbols et étude de l'influence des toxines

Les résultats du test d'activité des peptaïbols sur larves de diptères ont été regroupés dans le tableau P3-4. On constate une homogénéité dans les résultats obtenus sur chacune des trois larves.

Tableau P3-4 : Valeurs des activités larves et des moyennes respectives pour différentes doses de peptaïbols injectées

n° larves	1	2	3		
Dose injectée ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Activité larves 500/T			Moyenne	Ecartype
10	0,76	0,76	0,76	0,76	0
35	11,1	10,6	11,1	11,0	0
45	14,3	14,3	12,8	13,8	7,7
60	33,3	20,0	33,3	28,9	0,8
75	100	100	100	100	0
100	100	100	100	100	0

Suite à ces résultats, il a été possible de réaliser une courbe semi-logarithmique $AL = f(\text{dose})$ (figure P3-7). Grâce à cette courbe, il a été possible aussi de déterminer la concentration efficace 50 des peptaïbols.

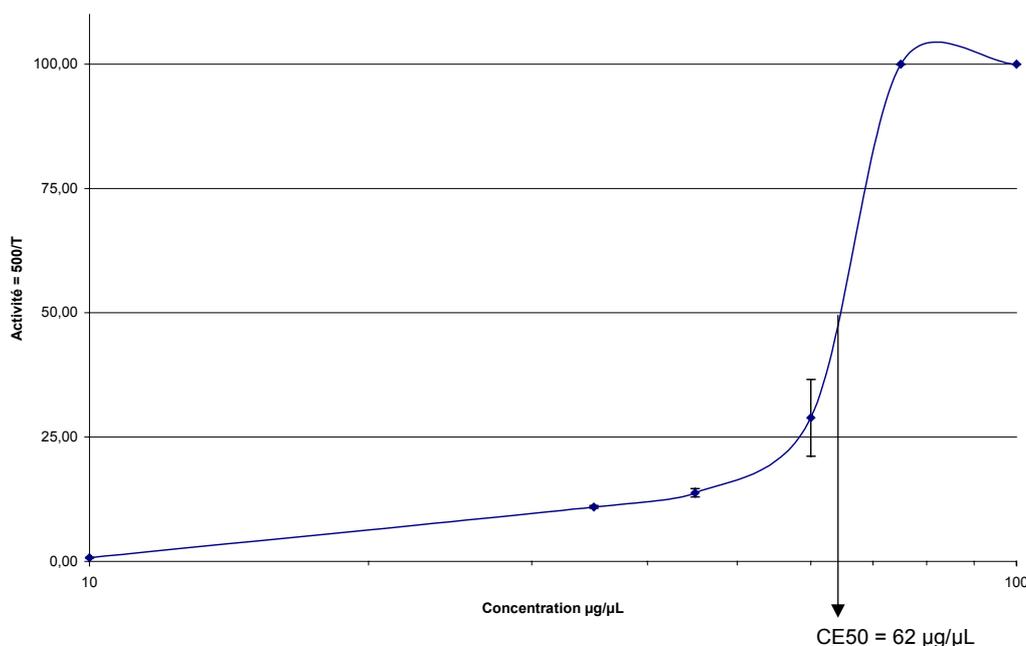


Figure P3-7 : Représentation graphique des activités larves en fonction des doses injectées pour les peptaïbols

La CE₅₀ déterminée sur ce graphique est de 62 µg/µL.

Dans les années 80-90, plusieurs cas de toxicité de coquillages des côtes françaises restées inexplicées, ont été détectés par le réseau de surveillance d'IFREMER. Les symptômes enregistrés alors sur les tests de toxicité sur souris étaient de type neurotoxique.

Cependant les concentrations en neurotoxines retrouvées alors (la saxitoxine par exemple) ne permettaient d'expliquer le phénomène.

Nous avons donc voulu savoir si une potentialisation était possible entre les peptaïbols et ce type de toxines. Pour cela nous avons réalisé l'étude en injectant ensemble la solution précédente de peptaïbols et une solution d'acide domoïque prise comme témoin.

Tableau P3-5 : valeurs des activités larves des peptaïbols, à différentes concentrations, après addition d'acide domoïque

n° larves	1	2	3	
Dose injectée (µg/µL)	Activité larves 500/T			Moyenne
3	3,33	2,78	2,94	3,02
7,75	4,81	4,72	5,00	4,84
15,5	20,00	20,00	25,00	21,67
31	71,43	50,00	50,00	57,14
44	100,00	100,00	100,00	100,00
62	100,00	100,00	100,00	100,00

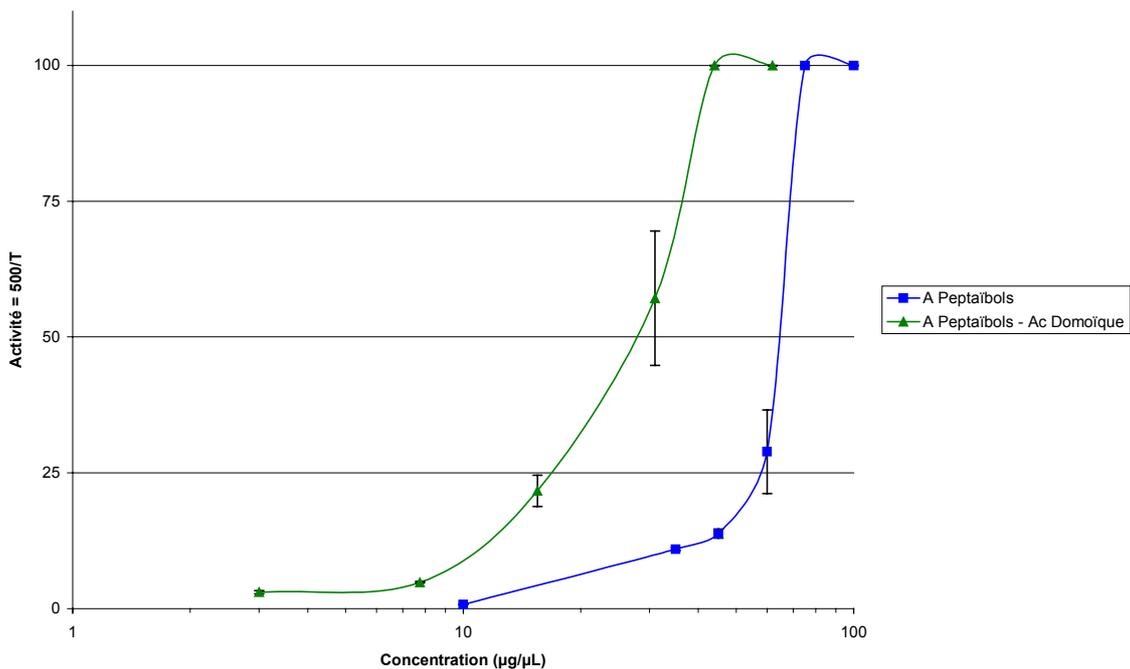


Figure P3-8 : comparaison graphique de l'activité des peptaïbols avec et sans acide domoïque

La comparaison des courbes de peptaïbols avec et sans acide domoïque (figure P3-8) montre bien un déplacement de l'activité et, dans ce cas, une potentialisation de l'activité des peptaïbols par une phycotoxine neurotoxique puisque la concentration efficace 50 des peptaïbols est passée de 62 à 27 µg/µL. L'activité toxique a donc été multipliée par 2,5. Il semble donc qu'une potentialisation soit envisageable.

Conclusion

Suite à des épisodes de toxicité et de mortalité de coquillages sur les côtes françaises, l'étude des champignons toxigènes a été entreprise. Après avoir effectué un recensement des espèces fongiques des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire, le groupe SMAB a montré la prédominance de plusieurs souches de champignons marins. Le genre *Trichoderma* étant très représenté, il a été pris comme modèle dans cette étude, car ses représentants sont connus pour produire des petits peptides, les peptaïbols.

Afin d'aller plus loin dans la connaissance de l'activité de ceux-ci, nous avons procédé à leur production à partir d'une souche marine de *Trichoderma koningii* cultivé sur des milieux à base d'eau de mer.

Les rendements d'extraction des peptaïbols confirment les résultats précédemment obtenus avec cette souche. Par contre l'étude, par spectrométrie de masse, de l'extrait purifié, a montré la présence d'un plus grand nombre de peptaïbols dans le mélange. Ceux-ci sont actuellement en cours d'identification. Néanmoins les résultats montrent l'intérêt de l'utilisation de la spectrométrie de masse à trappe d'ions pour l'identification et le séquençage de peptides sans nécessiter leur purification totale préalable.

Le but de l'étude étant de rechercher la neurotoxicité des peptaïbols, nous avons choisi d'utiliser, pour le faire, le test développé par Zlotkin pour la purification des toxines des venins de scorpions. Afin de savoir si ce test de toxicité aiguë sur larves de diptères pourrait être utilisé pour des toxines de polarités plus faibles, nous avons dans un premier temps étudié la réponse à ce test de différentes phycotoxines neurotoxiques. Il apparaît qu'elles conduisent toutes à une immobilisation immédiate des larves traitées, ce qui n'est pas le cas de l'acide okadaïque, toxine non neurotoxique prise comme référence. La CE_{50} semble être une valeur expérimentale intéressante pour évaluer l'activité de la toxine.

Sur ce modèle, le mélange de peptaïbols obtenu à partir des cultures de *Trichoderma koningii*, a conduit à une immobilisation immédiate des larves confirmant la neurotoxicité de ces peptides. La CE₅₀ de ces peptides est néanmoins relativement élevée (62 µg/µL) et supérieure à celles des toxines témoins. Donc si l'activité est réelle, on peut se demander si les risques encourus par les coquillages ou leur consommateurs sont importants ?

Néanmoins ces toxines ne pourraient-elles pas interagir avec les phycotoxines ? Le test d'un mélange de peptaïbols et d'acide domoïque a permis de multiplier l'activité toxique par un facteur d'environ 3. Il serait intéressant de pouvoir tester ces peptides avec la saxitoxine qui avait été retrouvée à l'état de traces dans les extraits toxiques de coquillages à Arcachon dans les années 90. Des problèmes d'approvisionnement de la toxine pure nous ont empêché de répondre provisoirement à cette question.

Ce travail a montré l'intérêt de l'utilisation de la spectrométrie de masse SMⁿ et du test de toxicité sur larves de diptères pour l'étude d'une famille de substances toxiques provenant d'organismes marins. Il sera prolongé par l'identification, nous l'espérons, de nouveaux membres de cette famille et l'étude de leurs toxicités individuelles.

Bibliographie

Beven L., Helluin O., Mole G., Doclohier H., Wroblewski H., 1999.

Correlation between anti-bacteril activity and pore sizes of two classes of voltage dependent channel-forming peptides.

Biochim.Biophys.Acta, 53-63.

Bodo B., 1996

Interactions antagonistes des Trichoderma dans les écosystèmes telluriques : substances chimiques impliquées.

Compte-rendu des 4^{èmes} Journées des Rencontres en Toxinologie, 16-18.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vaysier Y., Veau P., 1990.

Moisissures utiles et nuisibles; Importance industrielle.

Ed Masson, Paris, 511 p.

Brückner H., Pryzbylski M., 1984.

Isolation and structural characterization of polypeptide antibiotics of the peptaïbol class by high-performance liquid chromatography with field desorption and fast atom bombardement mass spectrometry.

J.Chrom., 296, 263-275.

De Moura Sarquis M.I. et Cunha De Oliveira P., 1996.

Diversity of microfungi in the sandy soil of Ipanema Beach, Rio de Janeiro, Brazil.

J. Basic. Microbiol. 36, 51-58.

Duval D., Riddell F.G., Rebuffat S., Platzer N., Bodo B., 1998.

Ionophoric activity of the antibiotic peptaïbol trichorzin PA VI : a ²³Na- and ³⁵Cl-NMR study.

Biochimica et Biophysica Acta, 1372, 370-378.

Eitan M., Fowler E., Herrmann R., Duval A., Pelhate M., Zlotkin E., 1990.

A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation : purification, primary structure and mode of action.

Biochemistry, 29, 5941-5947.

Esposito E., da Silva M., 1998.

Systematics and Environmental Application of the Genus *Trichoderma*.

Critical Reviews in Microbiology, 24(2), 89-98.

Euzeby J., 1994.

Mycologie Médicale et Comparée.

Ed fondation Merieux M., tome II.

Genilloud O., Pelaez F., Gonzalez I., Diez T.M., 1994.

Diversity of actinomycetes and fungi on seaweeds from the Iberian coasts

Microbiologia, 10, 413-422.

Ghisalberti E. L., Sivasithamparam K., 1991.

Antifungal Antibiotics produced by *Trichoderma* spp.

Soil Biol. Biochem., 23 (11), 1011-1020.

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 de l'Université de Nantes, 218p.

Harman G. E., 1996.

Trichoderma for Biocontrol of Plant Pathogens: from basic research to commercialised products.

Conference on Biological Control, april 11-13, 1996.

Hlimi S., Rebuffat G., Goulard C., Duchamp S., Bodo B., 1995.

Trichorzins HA and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum* II. Sequence determination.

J. Antibiot., 48 (11), 1254-1261.

Irmscher G., Jung G., 1977.

Die hämolytischen Eigenschaften der membranmodifizierenden Peptidantibiotika Alamethicin, Suzukacillin und Trichotoxin.

Eur. J. Biochem., 80, 165-174.

Iida A., Sanekata M., Fujita T., Tanaka H., Enoki A., Fuse G., Kanai M., Rudewicz P., Tachikawa E., 1994.

Fungal Metabolites. XVI. Structure of new peptaibols, trichokindins I-VII, from the fungus *Trichoderma harzianum*.

Chem. Pharm. Bull. 42 (5), 1070-1075.

Kohlmeyer J., Kohlmeyer E., 1979.

Marine mycology : the higher fungi.

Academic Press Ed., New York.

Landreau A., 2001.

Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii* Oudemans isolée du milieu marin: Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture.

Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes, 160p.

Landreau A., Pouchus Y.F., Sallenave-Namont C., Biard J.F., Boumard M.C., Robiou du Pont T., Mondeguer F., Goulard C., Verbist J.F., 2002.

Combined use of LC/MS and a biological test for rapid identification of marine mycotoxins produced by *Trichoderma koningii*.

Journal of Microbiological Methods, 48, 181-194.

Meyer C., Reusser F., 1967.

A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*.

Experientia, 23, 85-86.

Mohamed-Benkada M., Montagu M., Biard J.F., Mondeguer F., Pouchus Y.F., 2003.

Production de peptaïbols par des souches marines de *Trichoderma sp.*
J. de l'Asphète, 2003.

Nagaoka Y., Iida A., Kambara T., Tachikawa E., Asami K., Fujita T., 1995.

Effect of lipophilicity of trichosporin-Bs on ion channel formation and catecholamine-releasing activity.
Biol. Pharm. Bull., 18, 640-642.

Oeuvre collective, 1995.

Atlas of clinical fungi.
Ed de Hoog G. S. and Guarro J., 720p

Papavizas G. C., 1985.

Trichoderma and *Gliocladium* : Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol.
Ann. Rev. Phytopathol, 23, 23-54.

Ragnaud J.M., Marceau C., Roche-Bezian M.C., Wone C., 1984.

Infection péritonéale à *Trichoderma koningii* sur dialyse péritonéale continue ambulatoire.
Médecine et Maladies Infectieuses, 7/8, 402-405.

Roquebert M.F., 1996.

Interactions antagonistes des *Trichoderma* dans les écosystèmes telluriques :
Systématique, biologie et écologie des organismes.
Compte-rendu des 4^{ième} rencontres en toxinologie, 13-15.

Sallenave C., 1999.

Etude de la flore fongique des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire.
Recherche de souches toxigènes.
Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes, 194p.

Samson M.S.P., 1993.

Alamethicin and related peptaibols – model ion channels.

Eur. Biophys. J., 22, 105-124.

Samuels G. J., 1996.

Trichoderma : a review of biology and systematics of the genus.

Mycol. Res, 100 (8), 923-935.

Sivan A., 1987.

Biological control of Fusarium crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions.

Plant Disease, 71, 587-592.

Solfrizzo M., Altomare C., Visconti A., Bottalico A. and Perrone G., 1994.

Detection of peptaibols and their hydrolysis products in cultures of *Trichoderma* species.

Natural toxins, 2, 360-365.

Tachikawa E., Takahashi S., Furumachi K., Kashimoto T., Iida A., Nagaoka Y., Fujita T., Takaishi Y., 1991.

Trichosporin-B-III, an α -Aminoisobutyric Acid-Containing Peptide, Causes Ca^{2+} -Dependent Catecholamine Secretion from Adrenal Medullary Chromaffin Cells.

Molecular Pharmacology, 40, 790-797.

Toniolo C., Bonora G.M., Bavoso A., Benedetti E., Di Blasio B., Pavone V., Pedone C., 1983.

Preferred Conformations of Peptides Containing α,α -Disubstituted α -Amino Acids.

Biopolymers, 22, 205-215.

Zlotkine E., Fraenkel G., Miranda F., Lissitzky S., 1971.

The effect of scorpion venom on blowfly larvae. A new method for evaluation of scorpion venoms potency.

Toxicon, 9, 1-8.

Tableau A-4: Valeurs des activités larves pour l'acide domoïque et moyennes pour différentes doses de toxines injectées

n° larves	1	2	3	
Dose injectée (µg/µL)	Activité larves 500/T			Moyenne
0,025	1	1	1	1,00
0,05	1	1	1	1,00
0,06	19,23	26,32	8,2	17,92
0,07	33,33	33,33	15,15	27,27
0,09	55,56	62,5	62,5	60,19
0,125	100	100	100	100,00
0,25	100	100	100	100,00

Tableau A-5: Valeurs des activités larves pour l'acide okadaïque et moyennes pour différentes doses de toxines injectées

n° larves	1	2	3	4	5	
Dose injectée (ng/µL)	Activité larves 500/T					Moyenne
0,1	1	1	1	1	1	1
1,0	1,3	1	0,8	0,8	1,2	1,02
10	2,8	3,6	2	2,6	2	2,6
25	41,7	23	16,7	26	37	28,88
50	23	34	27	35	15	26,8

Vu, Le Président du Jury

Vu, Le Directeur de Thèse

Vu, le Directeur de L'U.E.R

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE**

**Année de Soutenance
2003**

Nom – Prénoms : RECULEAU-ARNOUD Xavier
Titre de la Thèse : Production et étude de toxicité des Peptaïbols d'une souche marine de *Trichoderma koningii*.

Résumé de la Thèse :

Suite à des épisodes de toxicité inexplicables de coquillages sur les côtes françaises, un recensement des espèces fongiques des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire a été entrepris. Le groupe SMAB a montré la prédominance de plusieurs souches de champignons marins dont le genre *Trichoderma*. Une souche de *Trichoderma koningii* détectée comme toxique lors de précédentes études a été prise comme modèle car elle s'est avérée productrice de métabolites neurotoxiques : les peptaïbols.

Afin d'avoir une meilleure connaissance de leur activité, une culture de la souche a été entreprise. Ces peptaïbols ont été analysés par spectrométrie de masse. Leur activité neurotoxique a été évaluée par le test de toxicité sur larves de diptères. Nous avons testé différentes phycotoxines neurotoxiques et non neurotoxiques pour démontrer la neurospécificité du test. La notion de CE₅₀ (concentration efficace 50) permettant la quantification de l'activité d'une toxine, a été introduite.

Sur ce modèle, le mélange de peptaïbols obtenus à partir des cultures de *Trichoderma koningii*, a conduit à une immobilisation immédiate des larves confirmant leur neurotoxicité. Nous avons recherché, par la suite, une éventuelle interaction entre les peptaïbols et les phycotoxines neurotoxiques.

Mots clés : *Trichoderma koningii*, phycotoxines, peptaïbols, test sur larves de diptères, neurotoxine

JURY

PRESIDENT :

Monsieur J.-F. BIARD, Professeur de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS :

Monsieur Y.F. POUCHUS, Professeur de Cryptogamie et de Botanique, Faculté de Pharmacie de Nantes

Madame B. MAULAZ, Praticien Hospitalier, Pharmacie Hôpital St Jacques, Nantes

Adresse de l'auteur : 88 rue Paul Bellamy
44000 Nantes