



HAL
open science

Étude du mécanisme d'action d'un peptide antifongique de la famille des héliomicines pour contrôler le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*

Thomas Aumer

► **To cite this version:**

Thomas Aumer. Étude du mécanisme d'action d'un peptide antifongique de la famille des héliomicines pour contrôler le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV038 . tel-02969903

HAL Id: tel-02969903

<https://theses.hal.science/tel-02969903v1>

Submitted on 17 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie Physique Moléculaire et Structurale**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Thomas AUMER

Thèse dirigée par **Philippe BULET**,
co-dirigée par **Céline LANDON** et
co-encadrée par **Thomas KNOBLOCH**

préparée au sein de l'**Institut pour l'Avancée des Biosciences**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Étude du mécanisme d'action d'un peptide antifongique de la famille des héliomicines pour contrôler le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*

Thèse soutenue publiquement le **16 octobre 2019**,
devant le jury composé de :

Monsieur Philippe BULET

Directeur de Recherche, Université Grenoble Alpes, Directeur de thèse

Monsieur Christophe BRUEL

Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1, Rapporteur

Monsieur Yvan RAHBÉ

Directeur de Recherche, INSA Lyon, Rapporteur

Madame Laurence SABATIER

Professeur, Université de Strasbourg, Présidente

Monsieur Benoît CHOVELON

Maître de conférences des universités – praticien hospitalier, CHU
Grenoble Alpes, Examineur

Madame Céline LANDON

Chargée de Recherche, CNRS Orléans, Invitée

Monsieur Thomas KNOBLOCH

Responsable de laboratoire, Bayer CropScience Lyon, Invité



Study of the mechanism of action of an antifungal peptide from the heliomicin family to control the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury, Christophe Bruel, Yvan Rahbé, Laurence Sabatier, Benoît Chovelon pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse à travers ce manuscrit et la soutenance associée.

Ce projet a été réalisé en collaboration industrielle entre l'Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB, Grenoble) sur la plateforme BioPark d'Archamps, le Centre de Biophysique Moléculaire (CBM, Orléans) et le Centre de Recherche de La Dargoire (CRLD, Bayer CropScience, Lyon). Je remercie ces laboratoires ainsi que le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation pour le financement de ces trois années de thèse à travers le dispositif Cifre.

Je souhaite sincèrement remercier mon directeur de thèse, Philippe Bulet, pour m'avoir accompagné tout au long de cette thèse. J'ai découvert avec un réel plaisir une personne passionnée et à même de transmettre son affection des peptides antimicrobiens et de la protéomique. Je sais à quel point ce sujet lui tenait à cœur et je le remercie pour sa confiance. Un grand merci à Céline Landon, ma co-directrice de thèse, pour sa supervision malgré la distance. J'ai toujours apprécié nos échanges que ce soit dans le cadre scientifique de la thèse ou dans l'ambiance détendue des journées MuFoPAM. Je remercie également mes encadrants industriels, Valérie Toquin puis Thomas Knobloch, pour leur disponibilité et l'ensemble des moyens mis à disposition pour garantir le succès de mes travaux de thèse.

Un remerciement spécial à Marie-Pascale Latorse pour ses conseils et encouragements donnés quatre ans auparavant à un jeune ingénieur hésitant, aujourd'hui en passe de devenir docteur.

Si cette thèse s'est aussi bien déroulée, c'est grâce aux formidables personnes qui m'ont entouré pendant mes travaux. Merci à Sébastien Voisin, Karim Arafah, Michel Bocquet pour leur accueil au sein de la plateforme BioPark, leur sympathie et leur assistance lors de mes recherches. Merci à Victor Masson pour sa contribution en amont de la thèse.

Un grand merci aux équipes du Centre de Recherche de La Dargoire et en particulier aux chercheurs du département Biochimie que j'ai pu côtoyer. Nombre d'entre eux m'ont accordé du temps pour répondre à mes questions ou pour m'aider lors de mes recherches. Merci notamment à Philippe Perret, Virginie Lempereur, Viviane Brozek, Stéphanie Gamet, Aurélia Vernay, Bénédicte Carcenac, Bénédicte Cirer, Bernd Essigmann, Catherine Sirven, Charlotte Perrin, Eric Paget, Flavie Coulombier-Chauvel, Florent Villiers, François Villalba, Frédéric Berniaud, Lisa Cabre, Luigi Di Vietro, Maxence Derbez, Mélissande Raphat, Nicole Bouvet, Pierrick Gautier, Rachel Baltz, Raphaël Fournel, Sébastien Rauscher, Stéphane Peyrard, Virginie Labaurie et Yoann Huet. Merci à mes collègues de bureau, Crystel Barbisan et Cécile Dorme, pour ces bons moments de détente.

Une pensée toute spéciale à mes parents. Vous avez toujours été présents et m'avez donné toutes les chances de réussir personnellement et professionnellement. Merci énormément.

Merci à mon frère, à ma famille, à mes proches et à mes amis Julien, Camille, Raphaël, Mathilde et Quentin pour leur soutien tout au long de ces trois ans.

Enfin, merci à toi Claire. J'ai eu la chance de ne pas traverser seul cette thèse et d'avoir pu compter sur toi chaque jour passant. Cette thèse est aussi un peu la tienne.

Je dédie cette thèse à mon grand-père Dédé.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DES ABREVIATIONS.....	16
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	21
1. Le champignon phytopathogène <i>Botrytis cinerea</i>	23
1.1. Les maladies fongiques.....	23
1.2. Le champignon <i>Botrytis cinerea</i>	24
1.2.1. Un modèle d'étude référence	24
1.2.2. Symptômes de la pourriture grise	25
1.2.3. Cycle d'infection	26
1.3. Contrôle de la maladie.....	27
1.3.1. Les traitements fongicides.....	27
1.3.2. La lutte contre <i>Botrytis cinerea</i>	28
1.3.3. Phénomènes de résistances aux fongicides	29
1.3.4. Enjeux socio-environnementaux	30
2. Les défensines.....	32
2.1. Découverte des défensines.....	32
2.2. Structure des défensines	34
2.2.1. Les défensines de vertébrés	34
2.2.2. Les défensines d'invertébrés	35
2.2.3. Les défensines de plantes.....	38
2.3. Les défensines antifongiques.....	40
2.3.1. Activités des défensines CS $\alpha\beta$	40
2.3.2. Propriétés antifongiques des défensines CS $\alpha\beta$	40
3. Mécanismes d'action des défensines antifongiques	44
3.1. Interaction avec la paroi cellulaire.....	44
3.2. Interaction avec la membrane plasmique	44
3.2.1. Composition lipidique de la membrane fongique	45
3.2.2. Les sphingolipides, une cible prometteuse.....	47
3.2.3. Identification des interactions lipides-défensines	48
3.3. Internalisation des défensines antifongiques	50
3.4. Mécanismes induits par les défensines antifongiques	53
3.4.1. Dérivés réactifs de l'oxygène	53
3.4.2. Perméabilisation de la membrane plasmique	54

3.4.3. Interférence dans l'homéostasie des cations	54
3.4.4. Mécanismes de tolérance des champignons.....	55
PROJET DE THESE	56
MATERIELS ET METHODES	61
Avant-propos.....	63
Matériel biologique	64
1. Études protéomiques.....	65
1.1. Pré-purification du peptide ETD151	65
1.2. Détermination de la concentration inhibitrice médiane	65
1.3. Traitement du mycélium pour les analyses protéomiques.....	66
1.4. Extraction protéique	66
1.5. Traitement du culot	67
1.6. Analyses par spectrométrie de masse à désorption laser assistée par matrice	67
1.6.1. Préparation des échantillons	67
1.6.2. Empreintes massiques par MALDI-MS.....	67
1.7. Analyses protéomiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse par électro-nébulisation à haute résolution.....	68
1.7.1. Préparation des échantillons pour une approche de type bottom-up	69
1.7.2. Analyses protéomiques par nanoLC-ESI-MS/MS	69
2. Analyse des sphingolipides du champignon <i>B. cinerea</i>.....	71
2.1. Préparation de la biomasse mycélienne	71
2.2. Extraction des sphingolipides de <i>B. cinerea</i>	71
2.3. Séparation et identification des sphingolipides de <i>B. cinerea</i>	73
2.4. Caractérisation structurale des sphingolipides de <i>B. cinerea</i>	73
3. Production du peptide ETD151 par la levure <i>S. cerevisiae</i>.....	74
3.1. Matériel biologique	74
3.2. Construction du plasmide pDEF151.....	74
3.3. Préparation du transformant W303 α (pDEF151).....	75
3.4. Culture des souches W303 α et W303 α (pDEF151).....	75
3.5. Production du peptide ETD151 recombinant (ETD151r)	76
3.6. Purification du peptide ETD151r.....	76
3.7. Extraction des protéines non sécrétées par la souche W303 α (pDEF151)	77
3.8. Identification du peptide ETD151r dans le surnageant d'expression	77
3.8.1. Séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide	77
3.8.2. Détection du peptide en Western Blot.....	78
3.9. Analyse des échantillons par MALDI-MS	78

3.10. Production du peptide ETD151r en fermenteur	79
3.11. Production du peptide ETD151r marqué par un isotope stable	79
3.12. Dessalage du peptide ¹⁵ N-ETD151r.....	80
4. Test d'activité sur la voie de réponse aux stress osmotiques	81
5. Approches par microscopie à fluorescence et microscopie confocale	83
5.1. Test d'activité antifongique sur les souches B047 et B05.10 de <i>B. cinerea</i>	83
5.2. Phénotypage de <i>B. cinerea</i> par microscopie à fluorescence.....	83
5.3. Marquage du peptide ETD151 par le fluorophore BODIPY FL	84
5.4. Identification du site de conjugaison sur le peptide ETD151-BODIPY	84
5.5. Localisation du peptide ETD151-BODIPY par microscopie confocale	85
TRAVAUX DE RECHERCHE	87
CHAPITRE I. Études protéomiques.....	89
Abstract.....	93
Introduction	94
Materials and Methods	97
Results and Discussion.....	104
Conclusions and Perspectives	121
Supporting Information	129
CHAPITRE II. Étude de l'interaction entre le peptide ETD151 et les glucosylcéramides du champignon <i>B. cinerea</i>.....	139
Introduction	141
Résultats et Discussions.....	143
II.1. Criblage du peptide ETD151 sur des mutants <i>Δgcs</i> de levures	143
II.2. Identification du gène <i>GCS</i> chez le champignon <i>B. cinerea</i>	145
II.3. Recherche de glucosylcéramides chez <i>B. cinerea</i>	147
II.4. Validation de l'approche par spectrométrie de masse	149
II.5. Caractérisation des glucosylcéramides du champignon <i>B. cinerea</i>	151
II.6. Validation de la souche recombinante W303α (pDEF151) de <i>S. cerevisiae</i>	156
II.7. Production du peptide recombinant ETD151r par W303α (pDEF151)	157
II.8. Production du peptide recombinant ETD151r en fermenteur.....	161
II.9. Production du peptide recombinant marqué ¹⁵ N-ETD151r	162
Conclusion	163

CHAPITRE III. Analyse du mécanisme d'action par des approches de microscopie	165
Introduction	167
Résultats et Discussions.....	168
III.1. Cinétique de croissance du champignon <i>B. cinerea</i>	168
III.2. Activité du peptide ETD151 sur les spores du champignon <i>B. cinerea</i>	169
III.3. Phénotypage du champignon <i>B. cinerea</i> en présence du peptide ETD151	170
III.4. Perturbation de la voie osmorégulatrice HOG.....	176
III.5. Marquage du peptide ETD151 par un fluorophore.....	177
III.6. Localisation subcellulaire du peptide ETD151-BODIPY	180
Conclusion	184
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	187
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	195
ANNEXES.....	215
ABSTRACT	232
RESUME.....	234

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Symptômes de la pourriture grise.....	25
Figure 2. Cycle de la maladie chez <i>Botrytis cinerea</i>	26
Figure 3. Connectivité des ponts disulfures chez les défensines <i>cis</i> et <i>trans</i>	33
Figure 4. Structures caractéristiques des défensines de vertébrés	34
Figure 5. Conservation du motif CSαβ	36
Figure 6. Structures caractéristiques des défensines d'invertébrés	37
Figure 7. Défensines identifiées parmi les PAMs de plantes riches en cystéine.....	38
Figure 8. Structures caractéristiques des défensines de plantes.....	39
Figure 9. Alignement des séquences de défensines antifongiques d'insectes et de plantes	42
Figure 10. Représentation schématique de la composition lipidique membranaire chez les champignons.....	45
Figure 11. Structures et biosynthèse des glycosphingolipides	46
Figure 12. Résumé des partenaires membranaires connus pour les défensines CSαβ antifongiques	49
Figure 13. Internalisation de la défensine MtDef4 chez les champignons <i>N. crassa</i> et <i>F. graminearum</i>	50
Figure 14. Internalisation de la défensine Psd1 chez les champignons <i>F. solani</i> et <i>C. albicans</i>	51
Figure 15. Internalisation de la défensine NaD1 et perméabilisation membranaire chez le champignon <i>F. oxysporum</i> . ..	52
Figure 16. Résumé des informations mécanistiques connues pour les défensines antifongiques de plantes	53
Figure 17. Alignement des séquences des défensines ETD151, ARD1 et héliomicine	56
Figure 18. Plan des microplaques de mycélium pour les analyses protéomiques.....	66
Figure 19. Récapitulatif du protocole d'extraction des sphingolipides de <i>B. cinerea</i>	72
Figure 20. Cascade de réactions enzymatiques permettant le dosage du glycérol intracellulaire	81
Figure 21. Activité antifongique des défensines RsAFP2 et ETD151 sur des mutants Δgcs de levures	143
Figure 22. Structures des standards lipidiques sélectionnés pour l'identification des glucosylcéramides de <i>B. cinerea</i> ..	147
Figure 23. Identification des glucosylcéramides de <i>B. cinerea</i> par chromatographie sur couche mince	148
Figure 24. Résolution de la structure du GlcCer de soja par spectrométrie de masse	149
Figure 25. Spectre ESI-MS/MS de l'ion m/z 758 associé au GlcCer de soja	150
Figure 26. Éluion et abondance relative des glucosylcéramides identifiés chez <i>B. cinerea</i>	151
Figure 27. Analyse de la structure du glucosylcéramide <i>Bc</i> -GlcCer-1 par spectrométrie de masse	152
Figure 28. Résolution de la structure du glucosylcéramide <i>Bc</i> -GlcCer-2 par spectrométrie de masse	153
Figure 29. Résolution de la structure du glucosylcéramide <i>Bc</i> -GlcCer-3 par spectrométrie de masse	154
Figure 30. Identification des précurseurs de <i>Bc</i> -GlcCer-3.....	155
Figure 31. Croissance des souches W303α et W303α (pDEF151) en milieu synthétique.....	156
Figure 32. Expression du peptide recombinant ETD151r par la souche W303α (pDEF151)	158
Figure 33. Analyses MALDI-MS du surnageant d'expression après purification.....	159
Figure 34. Analyses MALDI-MS du culot de levures après purification	160
Figure 35. Croissance de la souche W303α (pDEF151) en fermenteur	161
Figure 36. Germination des spores et élongation du tube germinatif chez le champignon <i>B. cinerea</i>	168
Figure 37. Inhibition de la croissance du champignon <i>B. cinerea</i> en présence du peptide ETD151.....	169

Figure 38. Effet du peptide ETD151 sur la germination des spores de <i>B. cinerea</i>	170
Figure 39. Phénotypage sur spores du champignon <i>B. cinerea</i> en présence du peptide ETD151 et du suloctidil .	172
Figure 40. Effet du peptide ETD151 sur la perméabilité membranaire chez <i>B. cinerea</i>	173
Figure 41. Phénotypage sur mycélium du champignon <i>B. cinerea</i> en présence d'ETD151 et de suloctidil.....	175
Figure 42. Dosage du glycérol intracellulaire chez <i>B. cinerea</i>	176
Figure 43. Conjugaison entre la forme BODIPY-FL NHS ester et la défensine ETD151	177
Figure 44. Analyses MALDI-MS des peptides ETD151 et ETD151-BODIPY (2F1) après digestion enzymatique .	179
Figure 45. Localisation subcellulaire du peptide ETD151-BODIPY chez le champignon <i>B. cinerea</i>	180
Figure 46. Internalisation du peptide ETD151-BODIPY par le champignon <i>B. cinerea</i>	181
Figure 47. Localisation du peptide ETD151-BODIPY sur les hyphes du champignon <i>B. cinerea</i>	182
Figure 48. Proposition de mécanisme d'action pour le peptide ETD151 sur le champignon <i>B. cinerea</i>	189
Vidéo 1. Time-lapse 24 h en présence de 0,39 μ M ETD151.....	174
Vidéo 2. Time-lapse 24 h en présence de 3,12 μ M ETD151.....	174
Vidéo 3. Time-lapse en présence de 0,19 μ M ETD151-BODIPY	182

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principaux fongicides utilisés contre le champignon <i>Botrytis cinerea</i>	29
Tableau 2. Synthèse des défensines antifongiques d'insectes et de plantes sélectionnées dans la littérature ...	43
Tableau 3. Composition des kits « Protein Calibration Standard I » et « Peptide Calibration Standard II »	68
Tableau 4. Descriptif des standards lipidiques commandés chez Avanti Polar Lipids	72
Tableau 5. Paramètres d'observation en microscopie inversée	83
Tableau 6. Paramètres d'observation en microscopie confocale	85
Tableau 7. Activité des défensines de plantes et d'insectes sur plusieurs espèces fongiques et leurs mutants Δgcs	144
Tableau 8. Identification par BLAST du gène <i>GCS</i> chez le champignon <i>Botrytis cinerea</i>	145
Tableau 9. Positionnement des fragments de l'ion m/z 758 sur la structure du GlcCer de soja	150
Tableau 10. Effets des défensines de plantes et d'insectes sur la morphologie et l'intégrité cellulaire des champignons cibles	171
Tableau 11. Analyses des fractions obtenues après conjugaison du fluorophore BODIPY FL au peptide ETD151	178
Tableau 12. Calcul des masses après digestion enzymatique des peptides ETD151 et ETD151-BODIPY	179

LISTE DES ABREVIATIONS

Les données présentes dans ce manuscrit sont exprimées dans les unités de base et dérivées du système international, référence des symboles. Les acides aminés sont reportés selon les abréviations et codes spécifiés par le comité de nomenclature commun IUPAC-IUBMB. Pour certains milieux et technologies utilisés, l'abréviation retenue est le terme anglophone.

4-HCCA	Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
ABC	Ammonium bicarbonate
ACN	Acétonitrile
ACTH	Adrénocorticotrophine
ADME	Absorption Distribution Métabolisme Excrétion
ADP	Adénosine diphosphate
APD	Antimicrobial Peptide Database
ATP	Adénosine triphosphate
BODIPY	Bore-dipyrométhène
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Albumine de sérum bovin
CAG	Contrôle automatique du gain
CBM	Centre de Biophysique Moléculaire
CCM	Chromatographie sur couche mince
CCSM	Centre Commun de Spectrométrie de Masse
CEX	Échange de cations
CHCl₃	Chloroforme
CI₅₀	Concentration inhibitrice médiane
CMH	Céramide monohexosique
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CRLD	Centre de Recherche de La Dargoire
CWI	Cell Wall Integrity
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DCM	Dichlorométhane
DDA	Acquisition de données dépendantes
DEPC	Diéthylpyrocarbonate

dhCer	Dihydrocéramide
DMF	N, N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique/absorbance
DTT	Dithiothréitol
EC	Énergie de collision
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
ESI	Ionisation par électronébuliseur
ESID	Détecteur lumière transmise
Et₂O	Éther diéthylique
EtOH	Éthanol
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee
Gal	Galactose
GAR	Goat Anti-Rabbit
GCS	Glucosylcéramide synthase
GFP	Green Fluorescent Protein
GIPC	Glycosyl-inositol-phosphoryle-céramide
GK	Glycérol kinase
GL	Glycosphingolipide
Glc	Glucose
GlcCer	Glucosylcéramide
GPL	Glycérophospholipide
GYPm	Glucose Yeast mycological Peptone
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HDP	Host Defense Peptide
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HNP	Human Neutrophil Peptide
HOG	High-Osmolarity Glycerol
HRP	Peroxydase de raifort
IAA	Iodoacétamide

IAB	Institut pour l'Avancée des Biosciences
ICBMS	Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires
IPC	Inositol-phosphoryle-céramide
KOH	Potasse
	Chromatographie en phase liquide
LC	<i>FPLC/HPLC/UPLC : Fast Protein/High Performance/Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
L-LDH	L-lactate déshydrogénase
M(IP)₂C	Mannosyl-diinositol-phosphocéramide
MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MeOH	Méthanol
MES	Acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique
MET	Microscopie électronique en transmission
MIPC	Mannose-inositol-phosphoryle-céramide
MOPS	Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
	Spectrométrie de masse
MS	<i>HRMS : High Resolution Mass Spectrometry</i>
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NaOH	Hydroxyde de sodium
NC	Nitrocellulose
NH₄OH	Ammoniaque
NHS	N-Hydroxysuccinimide
OH-Cer	α-dihydroxycéramide
OH-Δ8-Cer	α-hydroxy-Δ8-céramide
PA	Acide phosphatidique
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAM	Peptide antimicrobien
PC	Phosphatidylcholine
PCD	Programmed Cell Death
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
PDB	Protein Data Bank

PE	Phosphatidyléthanolamine
PEG	Polyéthylène glycol
PEP	Phosphoénolpyruvate
PES	Polyéthersulfone
PG	Phosphatidylglycérol
PI	Phosphatidylinositol
PI(3,5)P₂	Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate
PK	Pyruvate kinase
pO₂	Pression partielle d'oxygène
PSM	Poste de sécurité microbiologique
QoI	Inhibiteur externe de la quinone
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Tour par minute
SDHI	Inhibiteur de la succinate déshydrogénase
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SFCA	Acétate de cellulose exempté de tensio-actif
SPE	Extraction en phase solide
SPR	Résonance plasmonique de surface
TBS	Tris-Buffered Saline
TFA	Acide trifluoroacétique
TGS	Tris-glycine-SDS
TI	Temps maximum d'injection des ions
TMR	Tétraméthylrhodamine
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultraviolet
v/v	Volume/volume
WT	Wild Type - Souche sauvage
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*

1.1. Les maladies fongiques

Les champignons, aussi appelés mycètes, sont des organismes eucaryotes apparus il y a environ 1,5 milliard d'années et appartenant au super-règne des Opisthochontes (Adl *et al.*, 2005). De récentes estimations suggèrent l'existence de 2,2 à 3,8 millions d'espèces de champignons, mais seulement 120 000 ont pour l'instant été décrites (Hawksworth & Lücking, 2017). La grande majorité des champignons est saprophyte, ils se nourrissent de nutriments issus de matière organique morte ou en décomposition. Certaines espèces ont néanmoins développé des relations plus étroites avec les êtres vivants telles que la symbiose (lichen, mycorhize) ou le parasitisme. Les espèces parasites sont considérées comme pathogènes dès le déclenchement d'une maladie en infectant les êtres humains (levures de type *Candida* ou champignons filamenteux de type *Aspergillus*) (Zeilinger *et al.*, 2016), les animaux ou encore les plantes (Perez-Nadales *et al.*, 2014). Environ 600 espèces fongiques ont été identifiées comme étant des pathogènes pour l'homme (Brown *et al.*, 2012). Certains de ces champignons représentent aujourd'hui une menace croissante pour la santé humaine (candidémies, pneumocytoses, aspergilloses ou cryptococcoses), notamment pour les patients immunodéprimés dont le nombre est en constante augmentation (Köhler *et al.*, 2015).

Les champignons pathogènes représentent également une menace émergente pour la santé animale, illustrée par le récent déclin de plusieurs espèces sauvages. À titre d'exemple, le champignon *Geomyces destructans*, responsable du « syndrome du nez blanc », dévaste les populations de chauves-souris aux Etats-Unis et au Canada. Le champignon *Batrachochytrium dendrobatidis* est également connu pour infecter plus de 500 espèces d'amphibiens dans 54 pays différents à travers le monde (Fisher *et al.*, 2012).

Les champignons constituent surtout une menace à l'encontre des plantes avec plus de 8 000 espèces phytopathogènes (Agrios, 2005). Ravageant de nombreuses cultures d'intérêt agricole, les maladies fongiques ont été à l'origine de nombreuses famines, à l'image du champignon *Phytophthora infestans* en partie responsable de la Grande Famine ayant touché l'Irlande au XIX^e siècle (Birch & Whisson, 2001). Les champignons phytopathogènes sont à l'origine d'importantes pertes économiques, causant près de 85 % des maladies affectant les plantes (Isleib, 2012). Ils représentent ainsi un risque sérieux pour la sécurité alimentaire mondiale (Pennisi, 2010). L'influence des maladies fongiques est directement liée à l'étendue

des productions agricoles impactées. C'est notamment le cas des céréales (maïs, blé, riz) constituant la première culture agricole mondiale avec plus de 700 millions d'hectares cultivés et 2,6 milliards de tonnes produites en 2016/2017 (USDA, 2018). Les infections fongiques détruisent chaque année plus de 125 millions de tonnes des cinq principales cultures mondiales : riz (pyriculariose causée par *Magnaporthe grisea*), blé (septoriose par *Septoria tritici* et rouille noire par *Puccinia graminis*), maïs (charbon du maïs par *Ustilago maydis*), pomme de terre (mildiou par *Phytophthora infestans*) et soja (rouille asiatique par *Phakopsora pachyrhizi*). Le contrôle de ces phytopathogènes permettrait de nourrir 600 millions de personnes supplémentaires chaque année (Fisher *et al.*, 2012).

1.2. Le champignon *Botrytis cinerea*

Parmi les nombreuses infections fongiques ciblant des plantes d'intérêt agronomique, *Botrytis cinerea* est un champignon filamenteux polyphage capable d'infecter plus de 200 espèces végétales différentes à travers le monde (van Kan, 2006). Il est membre de la famille des *Sclerotiniaceae*, ordre des *Helotiales*, classe des Leotiomycètes au sein de la division des Ascomycètes (Beever & Weeds, 2007). Responsable de la pourriture grise, *B. cinerea* a été récemment classé par la communauté des phytopathologistes parmi les pathogènes les plus importants scientifiquement et économiquement (Dean *et al.*, 2012). *B. cinerea* est particulièrement dévastateur pour les cultures en plein champ ou en serre telles que l'horticulture maraîchère ou fruitière, la floriculture et la viticulture. Les dommages peuvent avoir lieu pendant la production ou après la récolte, expliquant des pertes réellement conséquentes dans les exploitations sans contrôle de la maladie.

1.2.1. Un modèle d'étude référence

Ces dernières années, le nombre de génomes séquencés chez les espèces fongiques saprophytes et nécrotrophes a considérablement augmenté fournissant de nouvelles approches génomiques comparatives et fonctionnelles. Les espèces proches *Sclerotinia sclerotiorum* et *B. cinerea* ont notamment été les premiers Leotiomycètes et champignons phytopathogènes séquencés (Amselem *et al.*, 2011). Afin de proposer des méthodes innovantes de contrôle des maladies fongiques, de nombreux travaux sont menés afin d'élucider les stratégies générales utilisées par les champignons pour parasiter les plantes hôtes. *B. cinerea* est récemment devenu un des modèles de champignon phytopathogène les

plus étudiés, de par son importance économique mondiale mais également de par le développement de nombreux outils moléculaires (van Kan, 2006 ; Patel *et al.*, 2008). Les connaissances ont notamment été enrichies grâce au séquençage des souches B05.10 et T4 (Amselem *et al.*, 2011) mais également par des études de mutagenèse ciblée qui permettent d'élucider le rôle joué par de nombreux gènes lors du processus d'infection de *B. cinerea*. Ces données génomiques facilitent aussi les analyses fonctionnelles telles que la transcriptomique ou la protéomique (Liñeiro *et al.*, 2016).

1.2.2. Symptômes de la pourriture grise

Identifié comme un champignon nécrotrophe, *B. cinerea* secrète des phytotoxines non spécifiques d'une plante qui lui permettent de détruire les cellules végétales, les coloniser et se nourrir des tissus morts de l'hôte avant de poursuivre sa progression (van Kan, 2006). La pourriture grise cible préférentiellement les plantes dicotylédones, groupe d'espèces végétales angiospermes ou « plantes à fleurs », telles que la tomate, la framboise, la fraise, la vigne, le géranium ou la rose. Le champignon s'attaque en priorité aux fruits mais peut également toucher les différents organes d'une plante générant une large variété de symptômes : tâches, flétrissement, pourrissement des racines, des tiges ou des fruits (Figure 1). La maladie peut se déclarer sur des plantes parfaitement saines mais *B. cinerea* est généralement le plus destructeur sur des végétaux matures voire sénescents. Ces derniers possèdent en effet des tissus mous ou affaiblis pour lesquels les réactions de défense sont réduites ou négligeables en comparaison à des plantes en croissance active. Attendant que la physiologie de son hôte lui soit propice, le champignon peut rester latent pendant une longue période (Williamson *et al.*, 2007).



Figure 1. Symptômes de la pourriture grise

De gauche à droite, dommages observés sur tomate, fraise, grappe de raisin et géranium.

Crédits photos : Bayer SAS, Sandra Nitsch et Francesca Peduto Hand.

1.2.3. Cycle d'infection

Depuis une concertation internationale (XVI International Botrytis Symposium Bari, Italie, Juin 2013), la forme asexuée *B. cinerea* (anamorphe) et la forme sexuée *Botryotinia fuckeliana* (téléomorphe) ont été regroupées sous la même appellation *B. cinerea* (Elad *et al.*, 2016). La forme sexuée est très rarement observée dans la nature au contraire de la forme asexuée, cette dernière étant la forme étudiée en laboratoire.

Parmi les différentes formes morphologiques observées chez l'anamorphe *B. cinerea*, les sclérotés sont les structures primordiales pour la survie de l'espèce durant l'hiver. Constituées d'un agrégat irrégulier et dense de mycélium, elles apparaissent à la surface des tissus infectés lorsque les conditions deviennent défavorables au développement du champignon. Au printemps, les conditions de température et d'humidité permettent la germination des sclérotés et l'apparition d'hyphes, filaments constitutifs du mycélium. Ce dernier produit des conidiophores portant des conidies, spores assurant la multiplication asexuée du champignon (Holz *et al.*, 2007). Disséminées par le vent et la pluie, les conidies se déposent sur de nouveaux tissus végétaux et sont la source principale du cycle infectieux (Figure 2) dont les étapes sont très bien décrites dans la littérature (van Kan, 2006 ; Choquer *et al.*, 2007).

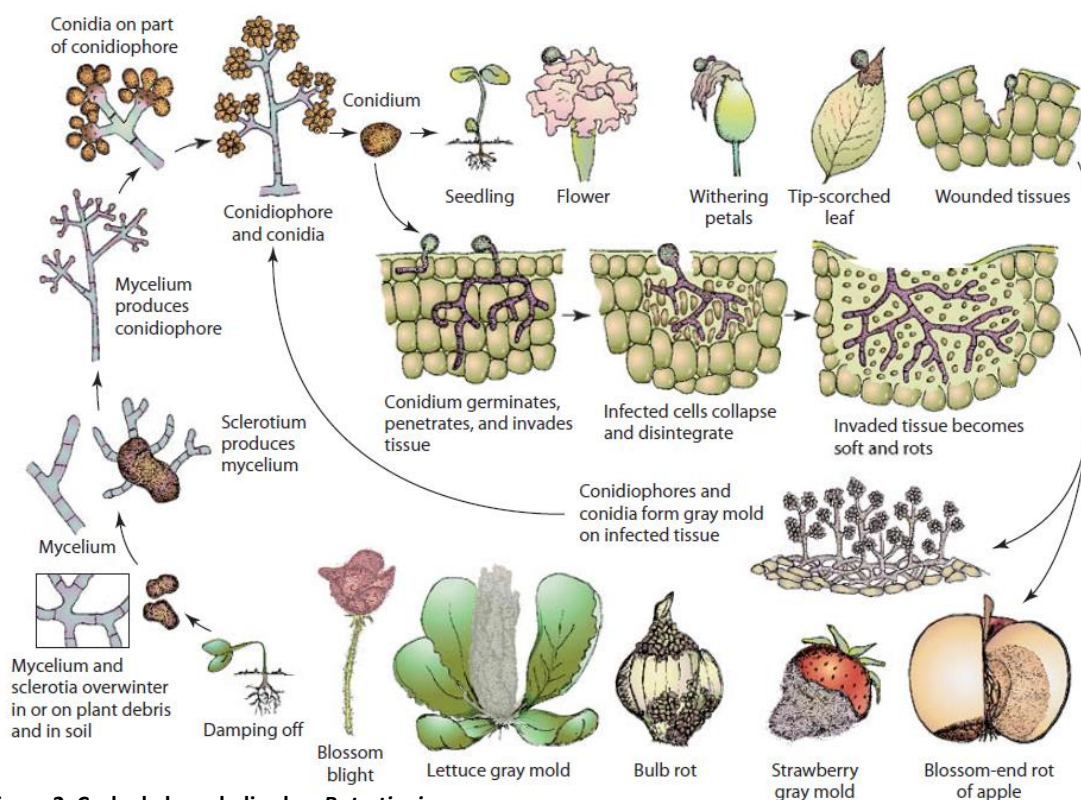


Figure 2. Cycle de la maladie chez *Botrytis cinerea*

Germination des sclérotés, génération de mycélium et production de conidies. Cycle infectieux et exemples de symptômes. Illustration issue de Agrios, 2005. Copyright Elsevier.

Après adhésion sur une plante hôte, une conidie développe un tube germinatif se différenciant ensuite en appressorium (Tenberge, 2007). D'autres structures similaires peuvent se former telles que des coussins d'infection, également identifiés chez le proche champignon phytopathogène *Sclerotinia sclerotiorum* (Hegedus & Rimmer, 2005). L'appressorium permet la pénétration du pathogène à la surface et la nécrose des tissus environnants en libérant de nombreuses enzymes lytiques (dégradation de la cuticule et la paroi cellulaire) (Doss, 1999), et des toxines telles que le botrydial (Kars & van Kan, 2007). La pénétration induit souvent un stress oxydatif chez l'hôte (Govrin & Levine, 2000). De plus, le champignon *B. cinerea* produit des dérivés réactifs de l'oxygène (« Reactive Oxygen Species » ou ROS) durant l'infection, tels que des peroxydes d'hydrogène (H₂O₂) s'accumulant rapidement dans les spores germées et les coussins d'infections.

La production rapide de ROS fait également partie d'une réaction hypersensible des plantes à une infection. Cette réponse est un élément clé de la mort cellulaire programmée (« Programmed Cell Death » ou PCD) et permet de limiter l'accès du pathogène infectieux aux sources de nutriments. Certains champignons nécrotrophes, tels que *B. cinerea*, bénéficient cependant de la PCD lors de l'interaction hôte-pathogène, favorisant leur progression et leur croissance (Greenberg & Yao, 2004 ; van Baarlen *et al.*, 2007). L'expansion des lésions et la décomposition progressive de la plante sont propices à l'apparition de conidiophores et conidies qui participeront au développement de la maladie sur de nouveaux tissus.

1.3. Contrôle de la maladie

1.3.1. Les traitements fongicides

L'utilisation de moyens de lutte antifongique est indispensable pour garantir la croissance optimale des cultures, les protéger des infections et maintenir des rendements élevés de production agricole. Ces moyens sont intégrés à l'ensemble des produits phytosanitaires, plus communément appelés pesticides. Ces derniers incluent également les herbicides ou les insecticides et assurent la protection des plantes. Le contrôle des maladies fongiques intègre des approches diverses telles que l'élaboration de variétés résistantes, des démarches prophylactiques ou l'utilisation d'agents de bio-contrôle (Moser *et al.*, 2008). Dans le cas de la lutte contre *B. cinerea*, ces moyens ne sont parfois pas suffisants pour une prévention complète de la maladie. Le traitement chimique, basé majoritairement sur l'application de composés fongicides de synthèse, constitue encore aujourd'hui le principal moyen pour une

protection efficace des cultures sensibles à la pourriture grise mais également à de nombreux champignons phytopathogènes (Fillinger & Walker, 2016).

Les premiers traitements fongicides ont été réalisés à l'aide de composés inorganiques (soufre, bouillie bordelaise) avant l'émergence dans les années 1940 des premiers composés organiques antifongiques (Russell, 2005). Ces molécules issues de la synthèse proposaient un large spectre d'activité et un mode d'action dit multi-sites, inhibant plusieurs processus biologiques essentiels. Dès 1970, de nouvelles classes de fongicides sont rapidement apparues avec des modes d'actions plus spécifiques, une toxicité réduite et une efficacité accrue. L'introduction progressive de ces différentes générations de composés organiques a notamment favorisé la réduction de plus de 60 % de la quantité de produits appliquée par hectare aux Etats-Unis de 1944 à 2002 (Morton & Staub, 2008). Les fongicides sont répertoriés par le « Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) » (Annexe 1) et répartis en fonction de leur cible spécifique en neuf classes (FRAC, 2018) : (A) la synthèse des acides nucléiques, (B) la mitose et la division cellulaire, (C) la chaîne respiratoire, (D) la synthèse des acides aminés et protéines, (E) la transduction des signaux, (F) la synthèse des lipides et l'intégrité membranaire, (G) la synthèse des stérols, (H) la synthèse de la paroi cellulaire et (I) la synthèse de la mélanine. La diversité de ces modes d'action ne reflète pas pour autant leur répartition sur le marché des fongicides. En effet, les inhibiteurs de la synthèse des stérols (G), et de la chaîne respiratoire (C) représentent à eux seuls 50 % des ventes (communication personnelle). En 2016, le marché des produits agrochimiques pour la protection des cultures représentait environ 50 milliards de dollars dont 13 milliards pour les solutions antifongiques (McDougall, 2017).

1.3.2. La lutte contre *Botrytis cinerea*

Il est souvent difficile d'évaluer les dégâts et de chiffrer les pertes générées par la pourriture grise à l'échelle mondiale (Dean *et al.*, 2012). Le coût global est généralement rapporté aux ventes de fongicides sur les segments de culture sensible à la pourriture grise. En 2017, le marché des molécules ciblant le champignon *B. cinerea* était estimé à 455 millions de dollars dont plus d'un tiers pour la protection des vignes. *B. cinerea* représente ainsi 7 % du marché mondial des fongicides (Données Bayer CropScience). Les classes de produits habituellement employés pour lutter contre *B. cinerea* sont présentées Tableau 1.

Tableau 1. Principaux fongicides utilisés contre le champignon *Botrytis cinerea*

Extrait des données publiées par Hahn, 2014.

Classes de fongicide (Produit)	Première utilisation	Site cible/mode d'action	Risque de résistance
Benzimidazoles (Carbendazime)	1968	β -Tubuline	Élevé
Dicarboximides (Iprodione)	1975	Osmorégulation	Moyen à élevé
Anilinopyrimidines (Cyprodinile)	1994	Inconnu	Moyen
Phénylpyrroles (Fludioxonile)	1995	Osmorégulation	Faible
QoI ^a (Strobilurine)	1996	Chaîne respiratoire (III) ^c	Élevé
Hydroxyanilides (Fenhexamide)	1999	Biosynthèse des stérols	Faible à moyen
SDHI ^b (Boscalide)	2004	Chaîne respiratoire (II) ^c	Moyen à élevé

^a QoI : Inhibiteur externe de la quinone^b SDHI : Inhibiteur de la succinate déshydrogénase^c Pour les inhibiteurs de la chaîne respiratoire, le complexe ciblé est précisé entre parenthèses

1.3.3. Phénomènes de résistances aux fongicides

L'introduction des fongicides site-spécifiques et leur utilisation accrue a conduit à la rapide émergence de souches résistantes (van den Bosch *et al.*, 2014). À l'image des résistances aux antibiotiques dans le domaine clinique, certains champignons phytopathogènes dont *B. cinerea* peuvent s'adapter aux moyens de lutte antifongique. Les phénomènes de résistance peuvent diminuer l'efficacité des traitements et nécessitent la mise en place d'alternance ou de mélange de produits ayant des modes d'action différents. Les premiers phénomènes de résistance ont fait leur apparition au sein des différentes populations de *B. cinerea* (Leroux *et al.*, 2002).

Ce problème de résistance est devenu un enjeu majeur dans la recherche de nouveaux fongicides car il diminue l'efficacité des produits fongicides et réduit le nombre disponible de molécules efficaces sur le marché. Le développement de résistance chez le champignon dépend du mode d'action chimique du composé, de la fréquence d'utilisation du produit et de l'habilité du pathogène à s'adapter. Chez les champignons, le mécanisme de résistance le plus important est la modification de la protéine ciblée par un fongicide, le plus souvent par mutation du gène codant pour cette protéine. Le FRAC compile l'ensemble des souches résistantes chez les champignons phytopathogènes et tient ces données à la disposition des agriculteurs.

1.3.4. Enjeux socio-environnementaux

Dans un projet d'agriculture durable, l'Union Européenne a défini dans sa directive 2009/128/EC des objectifs pour l'utilisation raisonnée des produits phytosanitaires et la réduction de leurs risques et impacts sur la santé humaine, animale et sur l'environnement (Parlement Européen, 2009). En 2016, la France était le deuxième marché européen des produits phytosanitaires et le troisième en produits fongicides (Eurostat, 2018). En ramenant les ventes de fongicides aux surfaces agricoles utilisées, la France occupait la 10^{ème} position des utilisateurs, légèrement au-dessus de la moyenne européenne (Statista, 2018). À la suite du Grenelle Environnement fin 2007, le gouvernement français a lancé le plan Écophyto 2018, réajusté en 2015 en plan Écophyto II. L'objectif principal est une réduction du recours aux produits phytosanitaires de 25 % d'ici 2020 et de 50 % à l'horizon 2050 (Ministère de l'Agriculture, 2015). Les axes du plan intègrent notamment l'évolution des pratiques et systèmes agricoles, la recherche et le développement de solutions innovantes pour la protection des cultures, et un usage amélioré des pesticides tout en garantissant une production performante.

Les produits phytosanitaires souffrent également d'une grande méfiance et d'importantes préoccupations au sein de la population. En 2017, une consultation publique réalisée par la commission européenne montre qu'une personne sur deux (52 % sur 9 847 réponses) n'a pas confiance dans les aliments d'origine européenne cultivés ou traités avec des pesticides. Pour les produits importés hors d'Europe, la crainte concerne trois personnes sur quatre (72 % sur 9 847 réponses) (European Commission, 2018). En France, une étude récente révélait que 93 % des personnes interrogées (sur un panel de 1 002 personnes âgées de 18 ans et plus) considèrent leur santé impactée par la présence de pesticides dans les aliments consommés (Ifop, 2017). Renforcés par l'importante médiatisation et les controverses autour de certains produits (glyphosate, néonicotinoïdes), les produits phytosanitaires sont aujourd'hui un enjeu sociétal majeur.

À l'échelle mondiale, la protection des cultures reste primordiale pour garantir la sécurité alimentaire, avec des rendements élevés de production agricole et des aliments sûrs à la consommation. Elle répond à la nécessité de nourrir une population mondiale sans cesse croissante avec environ 8,5 milliards de personnes en 2030 (United Nations, 2017). Les nouvelles solutions de protection devront également conserver leur efficacité face aux effets du changement climatique sur les cultures et leurs pathogènes avec une possible

diversification des infections touchant chaque plante ou une modification de la distribution géographique des maladies (Elad & Pertot, 2014). Ces enjeux socio-environnementaux combinés aux phénomènes de résistance et à l'évolution de la législation conduisent l'industrie agrochimique à s'adapter et à proposer des moyens novateurs dans la lutte contre les espèces phytopathogènes et les maladies des plantes.

Le développement des biotechnologies (sélection variétale, organismes génétiquement modifiés) et l'essor de l'agriculture digitale (suivi en temps réel, traitement de précision) s'inscrivent dans cette stratégie et ont permis une évolution considérable dans la protection des cultures (Kamthan *et al.*, 2016 ; King, 2017). En parallèle, la recherche autour des substances d'origine naturelle permet de développer des produits dits de biocontrôle (organismes vivants, médiateurs chimiques) comme le Serenade (*Bacillus subtilis*) mais également d'inspirer de nouveaux produits de synthèse comme les peptides ou les small RNA. Parmi les différentes opportunités, les industries se focalisent notamment sur la recherche de nouvelles molécules proposant des modes d'action novateurs, sans résistance existante, dont l'efficacité permet de réduire les quantités de traitement et dont la toxicité pour l'environnement est plus que réduite. Les peptides antimicrobiens et notamment la famille des défensines peuvent répondre à ces critères.

2. Les défensines

2.1. Découverte des défensines

Les organismes vivants sont régulièrement exposés aux attaques de divers agents pathogènes, nécessitant la mise en place de mécanismes de défense pour assurer leur survie. Au cœur du système immunitaire inné, dont la réponse est immédiate, rapide et peu spécifique, une stratégie de défense ancienne et largement répandue repose sur la création de peptides démontrant une activité antimicrobienne (Boman, 1995). Ces peptides antimicrobiens (PAMs) sont des composants clés du mécanisme unique de protection chez les invertébrés mais également de la première ligne de défense pour les vertébrés. Ils sont également désignés plus largement comme peptides de défense de l'hôte ou « Host Defense Peptides » (HDPs) (Brown & Hancock, 2006 ; Haney *et al.*, 2019).

Les PAMs présentent une diversité structurale particulièrement importante qui les rend difficiles à classer, leur nomenclature restant un débat ouvert. Cependant, certains points structuraux permettent de les organiser en trois grandes classes : (1) les peptides à ponts disulfures (par exemple les défensines), (2) les peptides linéaires adoptant une structure en hélices alpha et (3) les peptides linéaires non structurés riches en certains acides aminés (Mahlpuu *et al.*, 2016). La base de données « The Antimicrobial Peptide Database¹ » (APD), régulièrement actualisée, illustre cette très grande variété. Elle dénombre plus de 3 000 références de PAMs (décembre 2018) et permet notamment d'accéder aux séquences, aux activités biologiques ou encore aux structures des peptides (Wang *et al.*, 2016).

Les défensines composent aujourd'hui une des classes les plus importantes de PAMs. Bien que présentant des séquences d'acides aminés extrêmement diverses, cette famille est généralement constituée de peptides de 4 à 10 kDa, très majoritairement cationiques et contenant plusieurs paires de cystéines (formant 3 à 6 ponts disulfures). La base de données « Defensins Knowledgebase² » dénombre 363 références de défensines (Seebah *et al.*, 2007). Cependant, en l'absence de mise à jour récente, il est très probable que leur nombre soit aujourd'hui plus conséquent. Cette famille de peptides fut identifiée pour la première fois en 1983 dans des macrophages de poumons de lapins (Selsted *et al.*, 1983). Le terme « défensine » ne fit son apparition que deux ans plus tard après la purification dans des neutrophiles humains d'un mélange de peptides capables de détruire les bactéries

¹ <http://aps.unmc.edu/AP/>

² <http://defensins.bii.a-star.edu.sg/>

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (Ganz *et al.*, 1985 ; Selsted *et al.*, 1985). À la suite de cette découverte majeure, des peptides aux séquences et aux fonctions similaires furent progressivement caractérisés chez d'autres organismes eucaryotes et regroupés sous l'appellation « défensines ».

Isolées chez les plantes (Thomma *et al.*, 2002), les arthropodes dont les insectes (Bulet & Stöcklin, 2005 ; Yi *et al.*, 2014), les mollusques (Tincu & Taylor, 2004), ou les champignons (Shunyi Zhu, 2008 ; Wu *et al.*, 2014), les défensines apparaissent conservées à travers les différents règnes. Plusieurs classifications sont proposées pour les défensines en fonction des homologues de séquences en acides aminés et de la position des cystéines. Les quatre principaux groupes sont les défensines de plantes, les défensines d'insectes, les défensines de vertébrés de type α et celles de type β (Bulet *et al.*, 2004).

Des études phylogénétiques récentes ont démontré que les défensines de vertébrés d'une part, et les défensines d'invertébrés et de plantes d'autre part, constituaient en réalité deux super-familles structurales, phylogénétiquement totalement indépendantes (Shafee *et al.*, 2016, 2017) (Figure 3). Dans les défensines dites « *cis* », la paire de cystéines CXC présente dans le dernier brin β (coté C-terminal) forme toujours deux ponts disulfures avec les cystéines CXXXC de l'hélice α , ce qui correspond à un appariement 2:5 et 3:6 pour une défensine à 6 cystéines (C6), et un appariement 3:6 et 4:7 pour une défensine à 8 cystéines (C8).

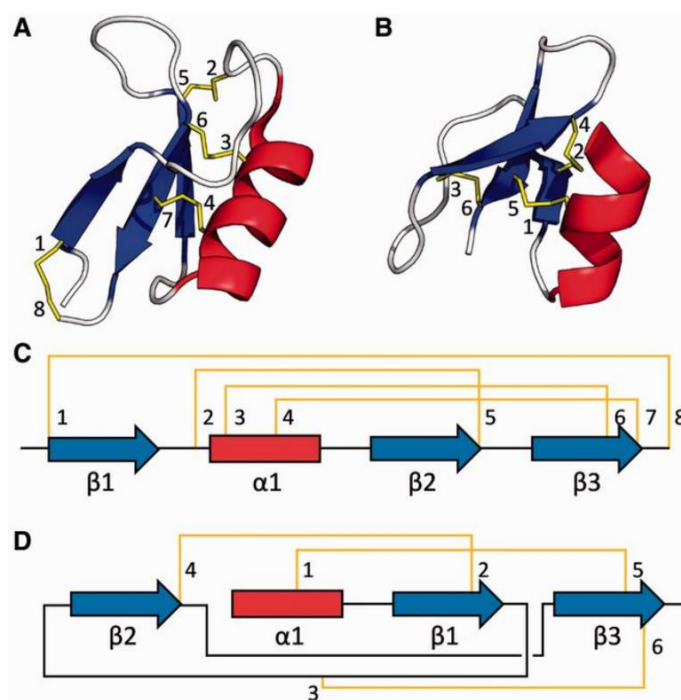


Figure 3. Connectivité des ponts disulfures chez les défensines *cis* et *trans*

(A) Représentation structurale de la défensine C8 de plante NaD1 (PDB : 1MR4), caractéristique des défensines *cis*. (B) Représentation structurale de la défensine β humaine HBD1 (PDB : 1IJV), caractéristique des défensines *trans*. Organisation des structures secondaires et ponts disulfures pour (C) les défensines C8 et (D) les défensines β . Adapté de Shafee *et al.*, 2016. Copyright Society for Molecular Biology and Evolution.

Dans les défensines dites « *trans* », la paire de cystéine adjacente CC du dernier brin de feuillet est impliquée dans deux ponts disulfures orientés dans des sens opposés, à l'image des défensines β (1:5 et 3:6). La super-famille *cis* regroupe les défensines CS $\alpha\beta$ de plantes, de champignons et la majorité des défensines d'invertébrés (y compris celles d'insectes). La super-famille *trans* regroupe majoritairement les défensines de vertébrés.

2.2. Structure des défensines

Les défensines – toutes origines confondues – sont stabilisées par un réseau de ponts disulfures dont l'arrangement varie selon les groupes. Leur structure contient obligatoirement un feuillet β à deux ou trois brins antiparallèles, et pour la majorité d'entre elles une hélice α . Après une brève présentation des défensines de vertébrés, cette section détaillera la super-famille des défensines d'invertébrés et de plantes, au cœur de ce projet de thèse.

2.2.1. Les défensines de vertébrés

Ce groupe de peptides peut être scindé en deux principales sous-familles : soit de type α comptant 29 à 35 résidus d'acides aminés, soit de type β comptant 36 à 42 résidus d'acides aminés. Ces défensines partagent une structure tertiaire commune composée d'un feuillet β à trois brins antiparallèles ($\beta\beta\beta$) et stabilisée par trois ponts disulfures.

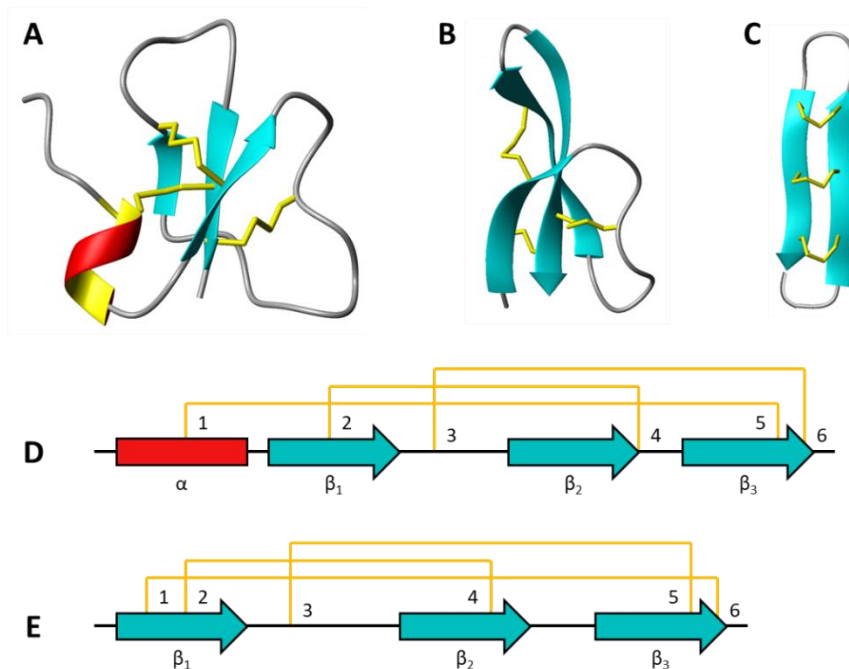


Figure 4. Structures caractéristiques des défensines de vertébrés

(A) Défensine β humaine hBD-1 (PDB : 1EAS) (Bauer *et al.*, 2001). (B) Défensine α humaine HD5 (PDB : 2LXZ) (Wommack *et al.*, 2012). (C) Défensine θ Retrocyclin-2 (PDB : 2ATG) (Daly *et al.*, 2007). Organisation des structures secondaires et connectivité des ponts disulfures pour (D) hBD-1 et (E) HD5. L'hélice α est représentée en rouge, les feuillets β en bleu et les ponts disulfures en jaune.

L'emplacement des cystéines dans la séquence d'acides aminés et leurs interconnexions permet de distinguer les défensines α affichant une connectivité 1:6, 2:4 et 3:5, et les défensines β de connectivité 1:5, 2:4 et 3:6 (Yang *et al.*, 2002) (Figure 4). Ces dernières, légèrement plus longues que leurs homologues α , peuvent présenter une hélice α du côté N-terminal ($\alpha\beta\beta\beta$), à l'image de la défensine β humaine hBD-1 (Bauer *et al.*, 2001).

Les défensines α ont été identifiées pour la première fois dans du sang humain sous l'appellation « Human Neutrophil Peptide » (HNP) (Selsted *et al.*, 1985). Ces peptides sont présents abondamment et exclusivement chez les mammifères (homme, singe, rongeur). Ils sont notamment exprimés dans les granules des neutrophiles, dans certaines populations de macrophages ou dans les cellules de Paneth du petit intestin (Ganz, 2003 ; Selsted & Ouellette, 2005). Les défensines β ont été découvertes dans les années 1990 chez le bovin, peptide TAP (Diamond *et al.*, 1991), et chez l'homme, peptide hBD-1 (Bensch *et al.*, 1995). Elles sont nombreuses chez les vertébrés et principalement produites dans les cellules épithéliales de systèmes muqueux tels que les voies respiratoires, le tube digestif et le tractus génito-urinaire (Lehrer & Ganz, 2002 ; Lehrer, 2004). Il est aujourd'hui admis que les défensines α dérivent des défensines β (Xiao *et al.*, 2004 ; Zhu & Gao, 2013).

La troisième sous-famille de défensines de vertébrés, de type θ , est le fruit de l'évolution et d'une cyclisation à partir de certaines défensines α (Selsted, 2004 ; Hazlett & Wu, 2011). Isolés dans un premier temps chez le macaque rhésus (Tang *et al.*, 1999), ces peptides sont beaucoup plus rares et retrouvés uniquement chez les primates non-humains (Wang, 2014).

2.2.2. Les défensines d'invertébrés

La recherche de nouveaux PAMs chez les arthropodes et les mollusques a permis de mettre en lumière des centaines de nouvelles défensines, chaque organisme produisant généralement plusieurs défensines (Otero-González *et al.*, 2010 ; Tassanakajon *et al.*, 2015). Il s'agit aujourd'hui de la famille la plus étendue au sein des peptides antimicrobiens d'invertébrés. Les premiers représentants de ce groupe ont été isolés sur deux espèces de mouches, *Sarcophaga peregrina* (Matsuyama & Natori, 1988) et *Phormia terranova* (Lambert *et al.*, 1989). Concernant les défensines de mollusques, la majorité est présente dans les hémocytes d'individus sains. Chez les insectes, les PAMs sont produits au niveau du corps gras (tissu équivalent du foie) et secrétés dans l'hémolymphe (équivalent du sang), le plus souvent en réponse à un stress ou une infection bactérienne, virale ou fongique (Bulet *et al.*, 2004).

La résolution des structures de la sapecine, défensine de *S. peregrina* (Hanzawa *et al.*, 1990), et de la défensine A de *P. terranova* (Cornet *et al.*, 1995) a contribué à l'élaboration d'un modèle structural pour les défensines d'invertébrés. Il comprend une hélice α et un feuillet β à deux brins antiparallèles ($\alpha\beta\beta$) entièrement stabilisés par trois ponts disulfures de connectivité 1:4, 2:5 et 3:6 (Lepage *et al.*, 1991). Ce motif structural a été retenu par la suite sous l'appellation « Cysteine-Stabilized α -helix β -sheet » (CS $\alpha\beta$) (Cornet *et al.*, 1995).

Ce motif, décrit auparavant pour des neurotoxines de scorpions (Bontems *et al.*, 1991 ; Kobayashi *et al.*, 1991) et pour des γ -thionines de plantes (Bruix *et al.*, 1993), est conservé parmi les défensines d'invertébrés (Tarr, 2016). D'un point de vue structural, une paire de cystéines séparée par trois acides aminés (Xaa, tout acide aminé autre que Cys) Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Cys est positionnée dans l'hélice α . Elle forme deux ponts disulfures avec une autre paire séparée par un seul acide aminé Cys-Xaa-Cys et positionnée dans le dernier brin. Le troisième pont disulfure relie le côté N-terminal au premier brin (β_1). La séquence peut être résumée de la façon suivante : Cys-Xaa_n-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-...-Cys-...-Cys-Xaa-Cys (Cornet *et al.*, 1995 ; Zhu *et al.*, 2005). Des travaux récents sur le venin du *Scolopendra subspinipes dehaani* (Liu *et al.*, 2012) ont mis en lumière la structure CS $\alpha\beta$ du peptide SLPTX15, stabilisée par seulement ces deux ponts disulfures (Dash *et al.*, 2019) (Figure 5).

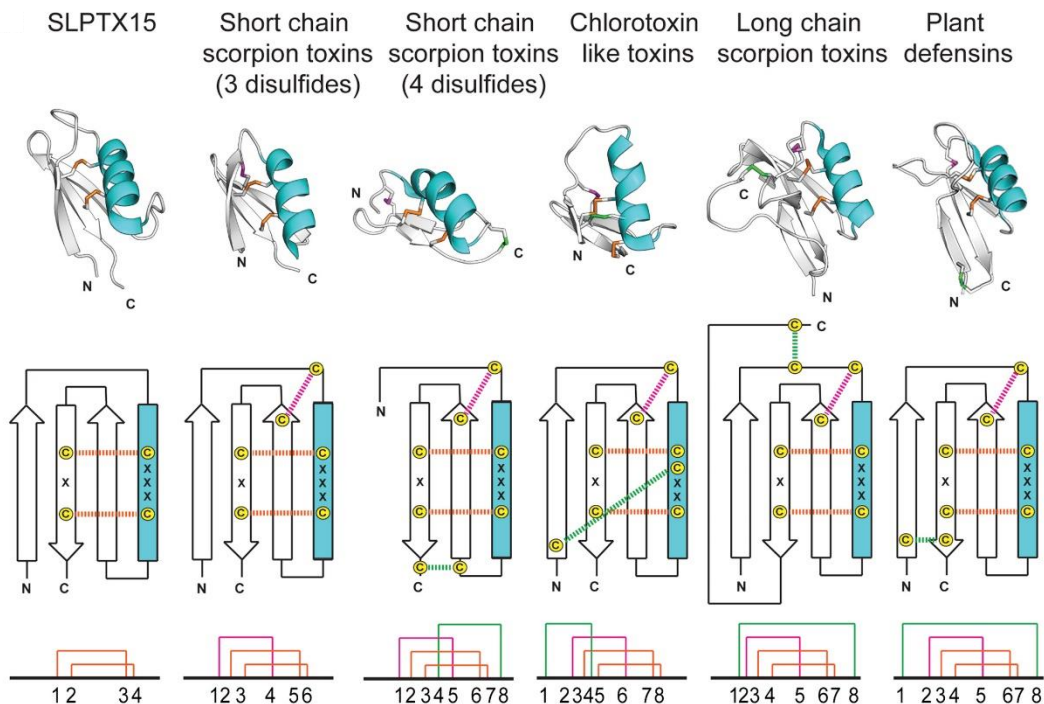


Figure 5. Conservation du motif CS $\alpha\beta$

Représentations structurales, structures secondaires et connectivité des ponts disulfures correspondant respectivement au peptide SLPTX15 (PDB : 6BL9), aux toxines de scorpions agitoxin 2 (PDB : 1AGT), HSTX1 (PDB : 1QUZ), chlorotoxin (PDB : 1CHL), LqhaIT (PDB : 2ASC) et à la défensine de plante NaD1 (PDB : 4AAZ). Adapté de Dash *et al.*, 2019. Copyright Elsevier.

Les autres défensines de type CS $\alpha\beta$ actuellement connues comportent toutes au moins un troisième pont. Certaines présentent des spécificités comme (i) un 3^{ème} brin de feuillet β , telle que l'héliomicine défensine du papillon *Heliothis virescens* (Lamberty *et al.*, 1999, 2001b) ; (ii) un 4^{ème} pont disulfure, à l'instar de MGD-1 défensine de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Hubert *et al.*, 1996 ; Yang *et al.*, 2000), et (iii) ces deux éléments, à l'image de la drosomyicine défensine de la mouche *Drosophila melanogaster* (Fehlbaum *et al.*, 1994 ; Landon *et al.*, 1997). Pour les défensines présentant un feuillet β à trois brins, le brin additionnel – côté N-terminal ($\beta\alpha\beta$) – ne participe pas strictement au motif CS $\alpha\beta$. Le quatrième pont disulfure, lorsqu'il est présent, relie ce brin additionnel à l'extrémité C-terminale et consolide la structure déjà compacte des défensines (Figure 6). Cette architecture dite $\beta\alpha\beta$ est commune à la majorité des défensines de plantes (van der Weerden & Anderson, 2013).

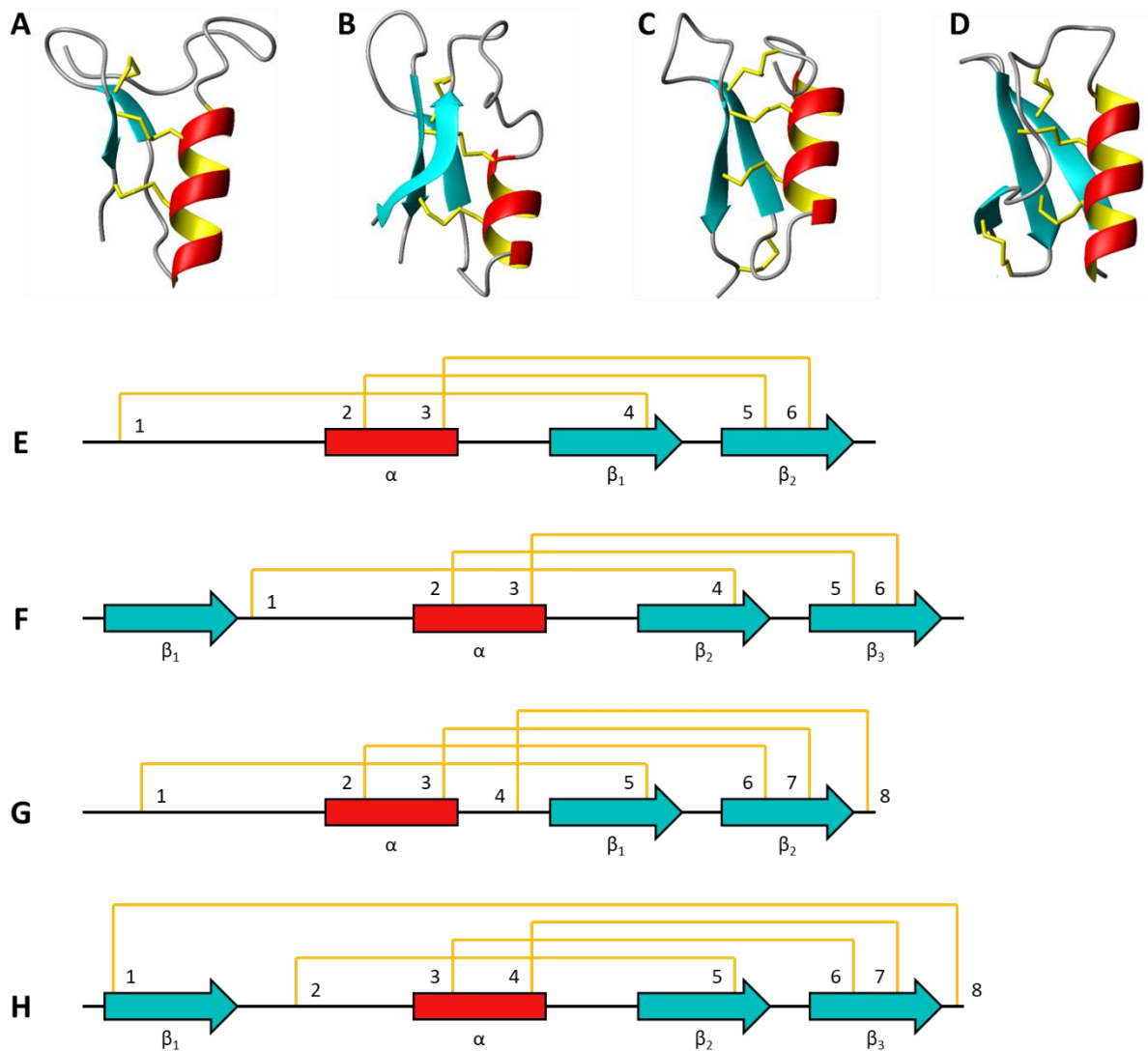


Figure 6. Structures caractéristiques des défensines d'invertébrés

(A) Défensine A (PDB : 1ICA) (Cornet *et al.*, 1995). (B) Héliomicine (PDB : 1I2U) (Lamberty *et al.*, 2001a). (C) MGD-1 (PDB : 1FJN) (Y.-S. Yang *et al.*, 2000). (D) Drosomyicine (PDB : 1MYN) (Landon *et al.*, 1997). Organisation des structures secondaires et connectivité des ponts disulfures pour (E) la défensine A, (F) l'héliomicine, (G) MGD-1 et (H) la drosomyicine. L'hélice α est représentée en rouge, les feuillets β en bleu et les ponts disulfures en jaune.

2.2.3. Les défenses de plantes

Les premiers représentants de ce groupe ont été identifiés en 1990 dans des grains de blé et d'orge (Colilla *et al.*, 1990 ; Mendez *et al.*, 1990) et reportés sous l'appellation γ -thionines. Par la suite, des analyses structurales sur les peptides RsAFP1 et RsAFP2, isolés à partir des graines du radis *Raphanus sativus* (Terras *et al.*, 1992), ont démontré que les γ -thionines étaient plus proches de la famille des défenses que des autres thionines (Broekaert *et al.*, 1995 ; Terras *et al.*, 1995). Ces travaux ont permis d'introduire le terme « défense de plante » correspondant à des peptides de 4 à 6 kDa, riches en cystéine et omniprésents dans le règne végétal. Produites le plus souvent dans les graines, les défenses peuvent également être localisées dans d'autres organes de la plante incluant les feuilles, les racines ou les fruits (De Coninck *et al.*, 2013). Les PAMs de plantes riches en cystéine ont été étudiés intensivement et rassemblés dans la base de données dédiée « PhytAMP³ », contenant notamment 55 références de défenses (Hammami *et al.*, 2009) (Figure 7).

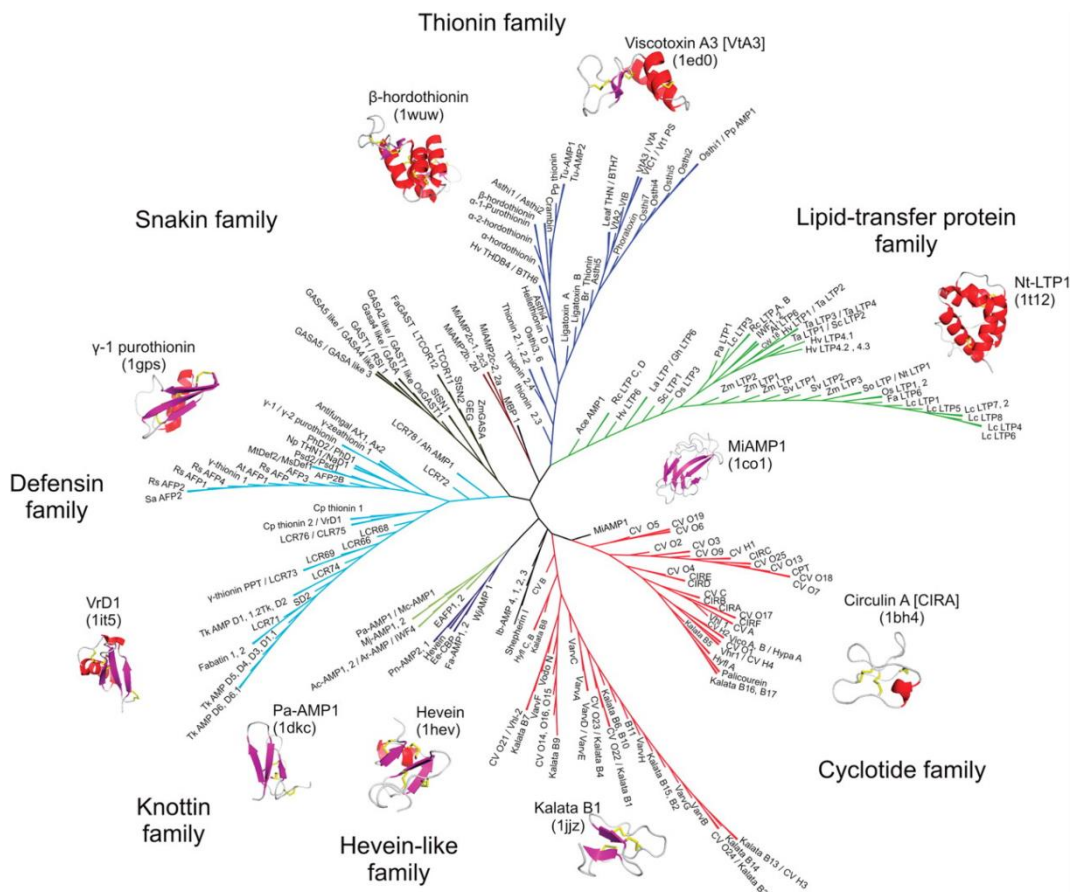


Figure 7. Défenses identifiées parmi les PAMs de plantes riches en cystéine

Arbre phylogénétique des PAMs de plantes compilés dans la base « PhytAMP » et basés sur un alignement multiple de 271 séquences de peptides. Les défenses sont représentées sur la gauche de l'arbre. Adapté de Hammami *et al.*, 2009. Copyright Nucleic Acids Research.

³ <http://phytamp.hammamilab.org>

Les structures de nombreuses défensines de plantes ont été résolues par RMN et déposées dans la base de données « The Protein Data Bank⁴ » (PDB) (Berman *et al.*, 2000 ; Burley *et al.*, 2019). À ce jour, une recherche manuelle dans PDB excluant tous les doublons et mutants a permis de retenir 16 structures dont les représentations des défensines Psd1 isolée chez le pois *Pisum sativum* (Almeida *et al.*, 2000, 2002), MtDef4 isolée chez la luzerne *Medicago truncatula* (Ramamoorthy *et al.*, 2007a ; Sagaram *et al.*, 2013), HsAFP1 isolée chez la plante *Heuchera sanguinea* (Osborn *et al.*, 1995 ; Vriens *et al.*, 2015) et RsAFP2 (Vriens *et al.*, 2016). Ces peptides présentent une hélice α et un feuillet β à trois brins ($\beta\alpha\beta$). Cet assemblage est organisé autour du motif $CS\alpha\beta$ et est généralement stabilisé par quatre ponts disulfures selon une connectivité 1:8, 2:5, 3:6 et 4:7 (Anderson, 2005) (Figure 8).

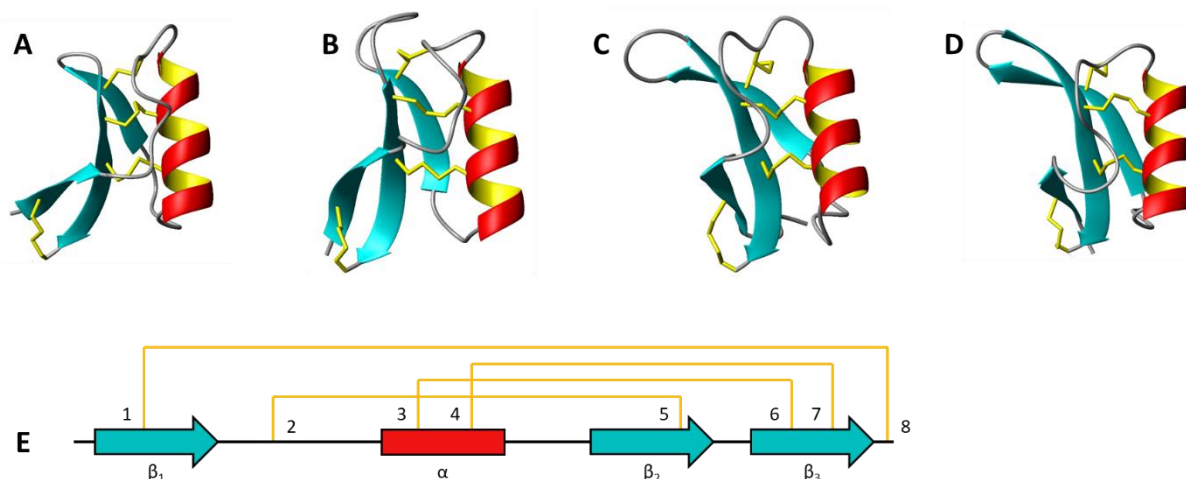


Figure 8. Structures caractéristiques des défensines de plantes

(A) Psd1 (PDB : 1JKZ) (Almeida *et al.*, 2002). (B) MtDef4 (PDB : 2LR3) (Sagaram *et al.*, 2013). (C) HsAFP1 (PDB : 2N2Q) (Vriens *et al.*, 2015). (D) RsAFP2 (PDB : 2N2R) (Vriens *et al.*, 2016). (E) Organisation des structures secondaires et connectivité des ponts disulfures pour les défensines de plantes. L'hélice α est représentée en rouge, les feuillets β en bleu et les ponts disulfures en jaune.

Au-delà de partager un motif commun $CS\alpha\beta$, les défensines d'invertébrés et de plantes peuvent démontrer des activités antibactériennes ou antifongiques similaires (Dias & Franco, 2015) détaillées par la suite.

⁴ <https://www.rcsb.org/>

2.3. Les défensines antifongiques

2.3.1. Activités des défensines CS α β

Les PAMs présentent un large spectre d'activités biologiques permettant de lutter diversement contre les pathogènes d'un organisme. Leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, ou encore antiparasitaires, sont répertoriées dans la base de données APD. À l'image des PAMs, les défensines CS α β présentent une importante diversité d'activités. Pour la majeure partie, elles sont caractérisées par des activités antibactériennes et/ou antifongiques, qui dépendent de l'origine du peptide (Silva *et al.*, 2014).

Les défensines d'insectes sont principalement reconnues pour leurs propriétés antibactériennes. Elles affichent une efficacité accrue contre les bactéries à Gram positif, dont des pathogènes de l'Homme, pour une concentration minimale inhibitrice (CMI) souvent de l'ordre du micromolaire. Les bactéries à Gram négatif, les levures et les champignons filamenteux sont généralement moins sensibles à ce groupe de peptides (Bulet & Stöcklin, 2005). À l'inverse, les défensines de plantes sont principalement reconnues pour leurs propriétés antifongiques et une activité contre une large variété de champignons incluant des pathogènes de l'Homme et des plantes (Vriens *et al.*, 2014). Dans le cadre de ce projet de thèse sur le champignon *B. cinerea*, nous nous focaliserons par la suite sur les défensines CS α β antifongiques, issues des plantes et de façon plus rare des insectes.

2.3.2. Propriétés antifongiques des défensines CS α β

De nombreuses revues détaillent les propriétés des défensines antifongiques (Cools *et al.*, 2017 ; Parisi *et al.*, 2018). Les défensines d'insectes et de plantes les mieux décrites dans la littérature, que ce soit pour leurs structures ou leurs activités, ont été présentées Tableau 2. Un alignement de leurs séquences a également été proposé en Figure 9.

Chez les insectes, parmi les neuf défensines d'insectes, toutes caractérisées par spectrométrie RMN, on dénombre quatre défensines antifongiques : la drosomycine, l'héliomicine, ARD1 et la termicine (Koehbach, 2017). Identifiées chez le papillon *Galleria mellonella*, la gallerimycin (Schuhmann *et al.*, 2003), la défensine *Galleria* (Lee *et al.*, 2004) et la défensine Gm (Cytryńska *et al.*, 2007) démontrent également une activité antifongique. Ces peptides n'ont pas été caractérisés structurellement. Les séquences des défensines *Galleria* et Gm partagent 90 % de similarité avec les séquences de l'héliomicine et l'ARD1, laissant supposer qu'elles adoptent aussi une architecture CS α β .

Isolée chez la mouche *Drosophila melanogaster*, la drosomycine est la première défensine exclusivement antifongique identifiée chez un insecte (Fehlbaum *et al.*, 1994). Ce peptide de 44 acides aminés est actif contre plusieurs champignons filamenteux incluant des pathogènes de l'Homme et des plantes (Zhang & Zhu, 2009). À des concentrations de l'ordre du micromolaire, la drosomycine retarde la croissance des champignons, altère la morphologie des hyphes et entraîne parfois une lyse partielle associée à une libération du matériel cytoplasmique. À des doses plus importantes (CMI > 10 μ M), le peptide inhibe complètement la germination des spores (Banzet *et al.*, 2002). À la différence des autres défensines d'insectes, la drosomycine comprend quatre ponts disulfures (agencement : 1:8, 2:5, 3:6 et 4:7) ce qui rend sa structure plus proche des défensines de plantes (Michaut *et al.*, 1996). La résolution de la structure 3D a montré une organisation de type CS α β incluant un troisième brin β du côté N-terminal ($\beta\alpha\beta\beta$) (Landon *et al.*, 1997). Excepté les cystéines, la drosomycine ne présente aucune similarité de séquence avec les défensines d'insectes antibactériennes.

L'héliomicine est un peptide de 44 acides aminés isolé chez le papillon *Heliothis virescens* (Lamberty *et al.*, 1999) partageant une séquence et une structure analogue ($\beta\alpha\beta\beta$) avec la drosomycine (50 % de similarité) et les défensines de plantes. Cette défensine ne comporte cependant que six cystéines (agencement : 1:4, 2:5 et 3:6) justifiant l'absence du quatrième pont disulfure joignant les extrémités C-terminale et N-terminale (Lamberty *et al.*, 2001b). L'héliomicine et la drosomycine présentent le même caractère amphiphile avec une face hydrophile (hélice α et brin β 2) et une face opposée hydrophobe (coude entre les brins β 2 et β 3), ce qui pourrait expliquer leur activité exclusivement antifongique. En effet, l'héliomicine affiche un large spectre d'activité ciblant plusieurs champignons pathogènes (Banzet *et al.*, 2002) mais également certaines levures. Isolée à partir de larves du papillon *Archeoprepona demophaon*, la défensine ARD1 présente seulement deux acides aminés différents en comparaison à l'héliomicine et partage le même spectre d'activité antifongique (Landon *et al.*, 2004). Les deux modifications Asp17Asn et Gly20Ala au niveau de l'hélice α ont accru l'efficacité d'ARD1 sur les champignons et notamment les pathogènes de l'Homme *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*.

La termicine isolée chez le termite *Pseudacanthotermes spiniger* est un peptide de 36 acides aminés combinant une activité antifongique contre les champignons filamenteux et certaines levures à faible concentration (CMI < 10 μ M) mais également une activité antibactérienne contre plusieurs bactéries à Gram positif (CMI > 50 μ M) (Lamberty *et al.*, 2001a). À la frontière entre les défensines d'insectes antibactériennes et antifongiques, la structure de la termicine

intègre trois ponts disulfures (agencement : 1:4, 2:5 et 3:6) et un motif CS α β comprenant un feuillet β à deux brins ($\alpha\beta\beta$). En terme d'activité, cette défensine est plus proche des défensines d'invertébrés et de mollusque à l'image de MGD-1 (Yang *et al.*, 2000), également active contre les bactéries à Gram positif, que de la drosomycine et de l'héliomicine (Silva *et al.*, 2003). La termicine présente cependant le même caractère amphiphile que ces deux défensines, expliquant une activité antifongique malgré une distribution différente des éléments hydrophobe et hydrophile.

Les défensines de plantes possèdent pour la majorité une activité antifongique contre un large spectre de champignons pathogènes des plantes et de l'Homme à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Elles peuvent le plus souvent être classées en deux groupes sur la base de leurs effets sur la croissance et la morphologie du champignon étudié. Les défensines morphogéniques génèrent une réduction de l'élongation mycélienne combinée à un phénomène d'hyper-ramification des hyphes. Les défensines non-morphogéniques ralentissent l'élongation du mycélium mais n'altèrent pas la morphologie des hyphes. Ce système de classification n'est cependant valable que pour un champignon et un milieu donné (van der Weerden *et al.*, 2013).

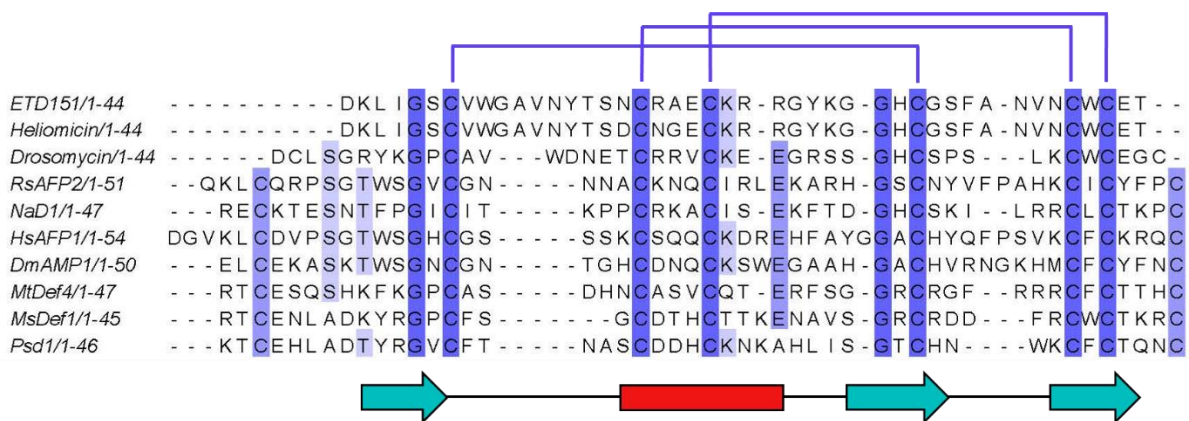


Figure 9. Alignement des séquences de défensines antifongiques d'insectes et de plantes

Les défensines antifongiques d'insectes et de plantes les mieux décrites dans la littérature ont été sélectionnées (détails en Tableau 2). Leurs séquences ont été alignées avec Clustal. Les résidus les plus conservés sont surlignés en bleu. Les structures secondaires du peptide ETD151 sont représentées en dessous de l'alignement (brin par des flèches bleues et hélice en rouge). Les ponts disulfures sont indiqués au-dessus.

Tableau 2. Synthèse des défensines antifongiques d'insectes et de plantes sélectionnées dans la littératureExtrait des données résumées par Cools *et al.*, 2017 et Parisi *et al.*, 2018. Les structures tridimensionnelles disponibles sont consultables à l'aide des codes PDB.

Défensines (Code PDB)	Espèces d'origine	Sources	Activités sur les levures et champignons pathogènes	Références
Drosomycine (1MYN)	Mouche du vinaigre <i>Drosophila melanogaster</i>	Hémolymphe	<i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Septoria tritici</i>	Fehlbaum <i>et al.</i> , 1994 ; Landon <i>et al.</i> , 1997
Héliomicine (1I2U)	Papillon <i>Heliothis virescens</i>	Hémolymphe	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>N. crassa</i> , <i>S. tritici</i>	Lamberty <i>et al.</i> , 1999, 2001c
ARD1 (1OZZ)	Papillon <i>Archaeoprepona demophon</i>	Hémolymphe	<i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i>	Landon <i>et al.</i> , 2004
Termicine (1MM0)	Termite <i>Pseudacanthotermes spiniger</i>	Glande salivaire	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>N. crassa</i> , <i>Nectria haematococca</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Trichoderma viride</i>	Lamberty <i>et al.</i> , 2001b; Silva <i>et al.</i> , 2003
RsAFP2 (2N2R)	Radis <i>Raphanus sativus</i>	Graine	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>S. tritici</i>	Terras <i>et al.</i> , 1992 ; Vriens <i>et al.</i> , 2016
Psd1 (1JKZ)	Pois cultivé <i>Pisum sativum</i>	Graine	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>N. crassa</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Almeida <i>et al.</i> , 2000, 2002
MsDef1	Luzerne cultivée <i>Medicago sativa</i>	Graine	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>N. crassa</i>	Gao <i>et al.</i> , 2000 ; Spelbrink <i>et al.</i> , 2004
MtDef4 (2LR3)	Luzerne tronquée <i>Medicago truncatula</i>	Graine	<i>F. graminearum</i> , <i>N. crassa</i> , <i>Puccinia tritici</i>	Ramamoorthy <i>et al.</i> , 2007b ; Sagaram <i>et al.</i> , 2013
DmAMP1	Dahlia <i>Dahlia merckii</i>	Graine	<i>A. flavus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>N. crassa</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. tritici</i> , <i>T. viride</i>	Osborn <i>et al.</i> , 1995
NaD1 (1MR4)	Tabac ailé <i>Nicotiana glauca</i>	Fleur	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Verticillium dahliae</i>	Lay <i>et al.</i> , 2003a, 2003b
HsAFP1 (2N2Q)	Heuchère <i>Heuchera sanguinea</i>	Graine	<i>A. flavus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. solani</i> , <i>N. crassa</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>S. tritici</i> , <i>T. viride</i>	Osborn <i>et al.</i> , 1995; Vriens <i>et al.</i> , 2015

3. Mécanismes d'action des défensines antifongiques

Comprendre l'activité des défensines antifongiques est crucial pour élaborer des applications pharmaceutiques ou agricoles futures (de Oliveira Carvalho & Moreira Gomes, 2011 ; de Souza Cândido *et al.*, 2014). Ces dix dernières années, cette famille de peptides a fait l'objet de recherches intensives pour identifier de nouveaux composés et élucider leurs mécanismes d'action (van der Weerden *et al.*, 2013 ; Vriens *et al.*, 2014). Le mécanisme d'action d'une défensine antifongique se décompose en plusieurs étapes : (1) une interaction avec un ou des composant(s) de la paroi cellulaire et/ou de la membrane plasmique du champignon, (2) le maintien à la surface ou l'internalisation du peptide et (3) une cascade d'effets ou une interaction avec une cible intracellulaire pouvant conduire à la mort cellulaire du champignon. Ces différentes étapes vont être détaillées par la suite à partir des informations présentes dans la littérature dédiée.

3.1. Interaction avec la paroi cellulaire

Pour atteindre un partenaire dans la membrane plasmique ou une cible intracellulaire, les défensines peuvent dans un premier temps interagir avec certains composants de la paroi cellulaire tels que les mannoprotéines ou les polysaccharides β -glucane et chitine. Parmi les défensines CS $\alpha\beta$ antifongiques, la défensine NaD1 du tabac (*Nicotiana glauca*) est aujourd'hui la seule pour laquelle une interaction avec la paroi cellulaire est nécessaire afin d'exercer son activité antifongique. Ce mécanisme a été mis en avant chez le champignon filamenteux *F. oxysporum* en présence de protéinase K et β -1,3-glucanase (van der Weerden *et al.*, 2010). En effet, ces deux enzymes ont dégradé les glycoprotéines et les β -1,3-glucanes de la paroi cellulaire aboutissant à une forme résistante du champignon *F. oxysporum* face à la défensine NaD1.

3.2. Interaction avec la membrane plasmique

Une fois la paroi cellulaire franchie, les défensines rencontrent la membrane plasmique connue pour être une cible privilégiée et particulièrement sensible aux PAMs. La membrane des champignons est composée d'une grande variété de composés lipidiques, offrant tout autant de partenaires d'interaction pour les défensines. Après une brève introduction des lipides membranaires, cette section détaillera le groupe des glucosylcéramides, au cœur de ce projet de thèse.

3.2.1. Composition lipidique de la membrane fongique

La caractérisation de la composition membranaire des champignons filamenteux a permis d'identifier les deux groupes de lipides ciblés préférentiellement par les défensines : les glycérophospholipides (GPLs) et les sphingolipides (Rautenbach *et al.*, 2016). Les stérols sont la troisième classe majeure de lipides composant la membrane des organismes eucaryotes. Les GPLs sont les composants lipidiques majoritaires (55-75 %) de la membrane fongique. Ils sont constitués d'une tête polaire et d'un glycérol relié à deux acides gras. La composition des GPLs varie parmi les différentes espèces de champignons filamenteux et de levures. Les formes majoritaires sont les suivantes : la phosphatidylcholine (PC), le phosphatidylinositol (PI), la phosphatidyléthanolamine (PE), l'acide phosphatidique (PA) et le phosphatidylglycérol (PG). Beaucoup plus minoritaire (7-16 %), les sphingolipides sont constitués d'une tête polaire et d'un squelette céramide, combinaison d'un acide gras et d'une sphingosine reliée par une liaison amide. Selon la tête polaire, ces lipides peuvent être divisés en deux sous-groupes : les phosphosphingolipides et les glycosphingolipides (GLs neutres ou acides), dont la structure sera représentée par la suite. La composition de la membrane plasmique des champignons est asymétrique, caractéristique typique des cellules eucaryotes, avec des phospholipides principalement dans le feuillet interne (face cytoplasmique) et des sphingolipides et stérols dans le feuillet externe (face extracellulaire) (Guimarães *et al.*, 2014) (Figure 10).

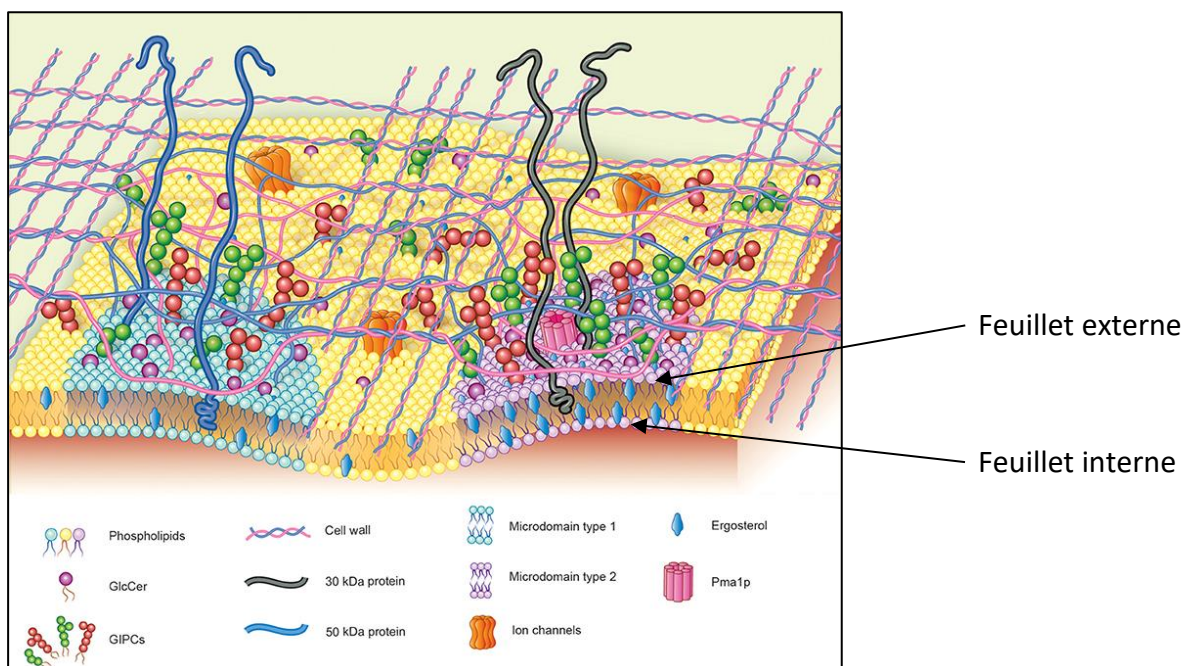


Figure 10. Représentation schématique de la composition lipidique membranaire chez les champignons
 Les glucosylcéramides (GlcCer) et les glycosyl-inositol-phosphoryle-céramides (GIPCs) sont deux formes courantes de glycosphingolipides (GLs), respectivement neutres et acides. L'ergostérol est un dérivé des stérols. Adapté de Guimarães *et al.*, 2014. Copyright 2014 Guimarães, Toledo, Ferreira, Straus and Takahashi.

Les GLs neutres contiennent des résidus de sucre non chargés de type glucose ou galactose. Le glucosylceramide (GlcCer) est la forme la plus courante chez les champignons, notamment identifiée chez *C. albicans* (Sakaki *et al.*, 2001), *C. neoformans* (Leverly *et al.*, 2000 ; Rodrigues *et al.*, 2000), *A. fumigatus* (Villas Boas *et al.*, 1994 ; Toledo *et al.*, 1999) ou encore *N. crassa* (Lester *et al.*, 1974 ; Park *et al.*, 2005). Dans la majorité des espèces fongiques, un GlcCer ou céramide monohexosique (CMH) est composé d'un céramide combinant une 9-méthyle- Δ 4- Δ 8-sphingosine (base sphingoïde) et un acide gras α -hydroxylé en C₁₆ ou C₁₈ (Rella *et al.*, 2016) (Figure 11A).

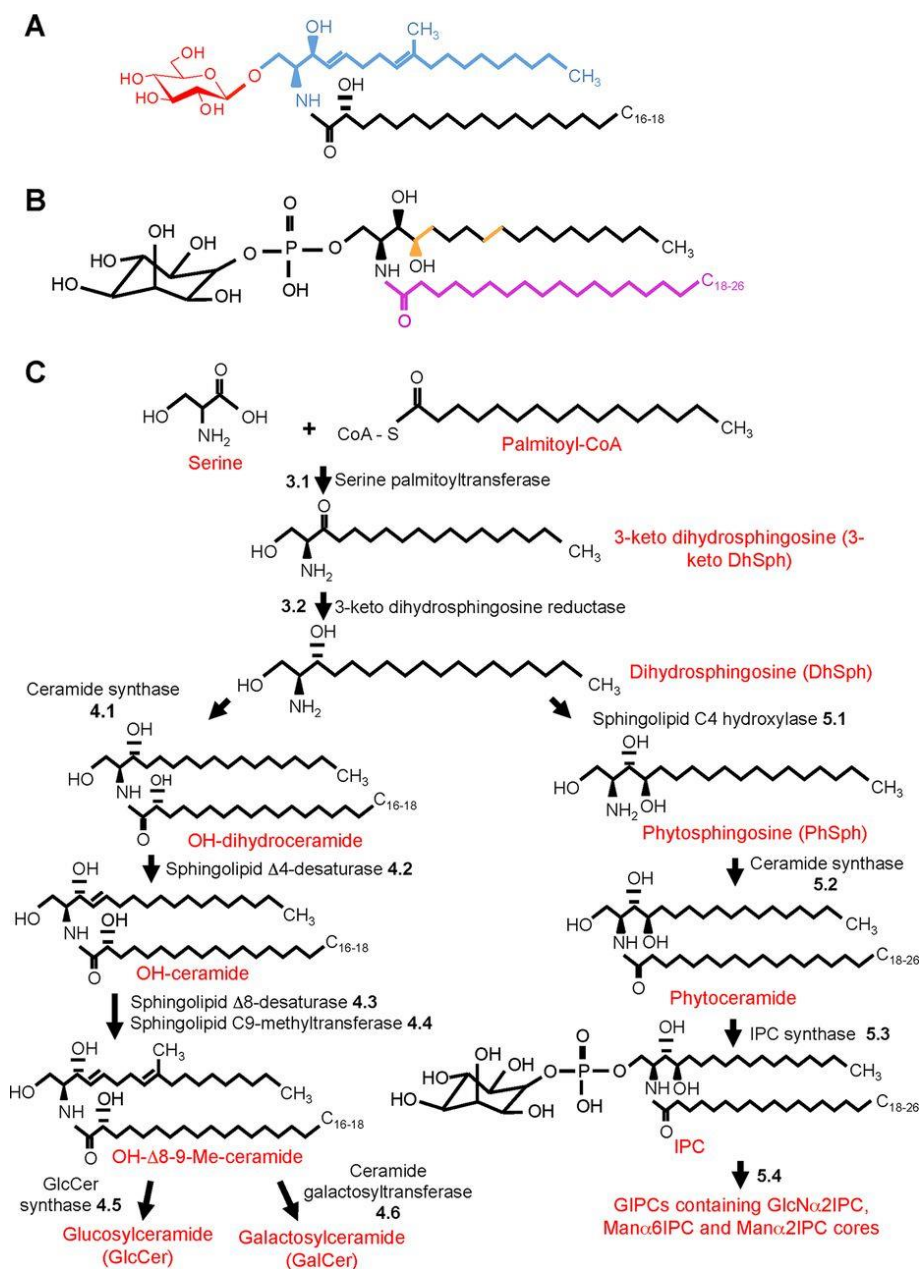


Figure 11. Structures et biosynthèse des glycosphingolipides

(A) Structure d'un glycosphingolipide neutre : base sphingoïde en bleu, chaîne acide gras C₁₆₋₁₈ en noir et résidu sucre en rouge. (B) Structure d'un glycosphingolipide acide : différences avec un GL neutre en orange et longue chaîne acide gras C₁₈₋₂₆ en violet. (C) Proposition de voie de biosynthèse des glycosphingolipides. Adapté de Fernandes *et al.*, 2018. Copyright American Society for Microbiology.

Les GLs acides contiennent des groupes fonctionnels ionisables (phosphate ou sulfate) ou des résidus de sucre chargés (acide glucuronique ou acide sialique). Les phosphoglycosphingolipides, connus également sous le terme glycosyl-inositol-phosphorylé-céramides (GIPCs), sont les formes les plus courantes chez les champignons. Ils sont composés d'un oligosaccharide relié par une liaison phosphodiester à une fraction céramide contenant une phytosphingosine et un acide gras à très longue chaîne C₂₄ ou C₂₆ (Figure 11B). Chez de nombreuses espèces fongiques, les principaux glycosphingolipides sont des GIPCs telles que le mannose-di-inositol-phosphorylé-céramide (M(IP)₂C), le mannose-inositol-phosphorylé-céramide (MIPC) et l'inositol-phosphorylé-céramide (IPC) (Fernandes *et al.*, 2018) (Figure 11C).

3.2.2. Les sphingolipides, une cible prometteuse

Les glucosylcéramides sont présents chez la plupart des champignons, malgré des exceptions comme les levures *S. cerevisiae* et *Candida glabrata* (Saito *et al.*, 2006), et sont conservés chez les organismes eucaryotes supérieurs tels que les plantes et les mammifères. Largement distribués à travers ces nombreuses espèces, la structure des GlcCer et les voies de synthèse, intégrant des intermédiaires distincts, varient d'un organisme à l'autre. Dans les cellules fongiques, la synthèse des GlcCer est initiée par la condensation de la palmitoyl-coenzyme A et de la sérine. Plusieurs enzymes et produits intermédiaires permettent d'obtenir le GlcCer fongique sous la forme d'une sphingosine : 9-méthyle- Δ 4- Δ 8- sphingadiénine, différente chez les mammifères avec une Δ 4- sphingénine. Chez les GlcCer de plantes, l'étape de méthylation est absente. La dernière étape de synthèse repose sur le transfert, par la glucosylcéramide synthase, d'un résidu glucose sur le céramide (Leipelt *et al.*, 2001 ; Ternes *et al.*, 2011). Les GlcCer sont ensuite transférés du Golgi vers la membrane plasmique ou sécrétés vers l'espace extracellulaire sous la forme de vésicules (Rodrigues *et al.*, 2000 ; Nimrichter & Rodrigues, 2011).

La synthèse des GlcCer ainsi que les modifications structurales des intermédiaires sont nécessaires pour la pathogénicité du champignon. La perturbation de l'enzyme sphingolipide Δ 8-désaturase chez *C. albicans* entraîne une réduction de la croissance des hyphes en milieu solide (Oura & Kajiwara, 2008). Des mutants de la levure *C. neoformans* dépourvus des enzymes sphingolipide C9-méthyltransferase (Δ smt1) et glucosylcéramide synthase (Δ gcs1) ne produisent pas de GlcCer, l'infectiosité s'en trouve fortement diminuée (Rittershaus *et al.*,

2006 ; Singh *et al.*, 2012). C'est pourquoi l'identification de molécules capables d'inhiber les enzymes impliquées dans la biosynthèse des GlcCer ou d'interagir spécifiquement avec les GlcCer fongiques - comme c'est le cas pour certaines défensines de plantes - ouvre la voie au développement de nouveaux composés antifongiques.

3.2.3. Identification des interactions lipides-défensines

Dans le cas des défensines antifongiques, l'existence de sites spécifiques d'interaction fut confirmée au début des années 2000 avec l'étude de la défensine HsAFP1. Une version radiomarquée de ce peptide fut développée et utilisée lors d'un test d'affinité pour mettre en compétition des hyphes du champignon *N. crassa* et des microsomes. Des valeurs d'affinité similaires avaient démontré que le site d'interaction de la défensine HsAFP1 se situait dans la membrane plasmique (Thevissen *et al.*, 1997).

Pour établir et confirmer ces interactions chez d'autres défensines (Thevissen *et al.*, 2003), plusieurs approches technologiques ont par la suite été développées telles que la construction de mutants résistants chez la levure (Thevissen *et al.*, 2000a), des tests biochimiques comme l'ELISA inversé (Thevissen *et al.*, 2004), des kits de lipides comme les bandes PIP (Poon *et al.*, 2014) ou encore des essais à base de liposomes (Payne *et al.*, 2016). Certains lipides tels que les GPLs sont essentiels pour la viabilité d'un champignon et ne permettent pas la préparation de certains mutants. Les kits de lipides fournissent une approche complémentaire pour déterminer les interactions entre défensines et lipides. En incubant le peptide d'intérêt avec ces membranes, il a été possible d'identifier entre autres les cibles des défensines de plantes MsDef1 (Sagaram *et al.*, 2013), MtDef4 (Sagaram *et al.*, 2013), NaD1 (Poon *et al.*, 2014) et HsAFP1 (Cools *et al.*, 2017a) (Figure 12). L'interaction de MtDef4 et HsAFP1 est la plus prononcée pour le phospholipide PA tandis que pour MsDef1 et NaD1, il s'agit respectivement des lipides PI(3,5)P₂ et PI(4,5)P₂ deux classes de phosphoinositides, dérivé phosphorylé de PI. Concernant les sphingolipides, l'utilisation de mutants a permis d'isoler et de caractériser plusieurs gènes déterminant la sensibilité de certaines espèces fongiques aux défensines (Figure 12). Des mutants dépourvus des gènes *IPT1* et *SNK1* chez la levure *S. cerevisiae* deviennent résistants à la défensine de plante DmAMP1 (Thevissen *et al.*, 2000a, 2000b, 2005). Le gène *IPT1* code pour l'enzyme impliquée dans la dernière étape de synthèse du sphingolipide M(IP)₂C, composant membranaire majeur chez *S. cerevisiae* (Dickson *et al.*, 1997). Le gène *SNK1* possède également un rôle important dans cette biosynthèse et d'autres fonctions au niveau de la paroi cellulaire (Roemer *et al.*, 1993).

Des mutants dépourvus du gène *GCS* chez plusieurs levures (*Pichia pastoris*, *C. albicans*) et champignons filamenteux (*F. graminearum*, *N. crassa*) deviennent moins sensibles aux défensines de plantes RsAFP2 (Thevissen *et al.*, 2004), MsDef1 (Ramamoorthy *et al.*, 2007a), Psd1 (de Medeiros *et al.*, 2014) et à la défensine d'insecte héliomicine (Thevissen *et al.*, 2004). Le gène *GCS* code pour l'enzyme céramide glucosyltransférase responsable de la dernière étape de glycosylation dans la voie de biosynthèse des GlcCer (Leipelt *et al.*, 2001). Ces défensines sont inactives sur *S. cerevisiae* et *Candida glabrata*, dépourvus de GlcCer (Saito *et al.*, 2006).

Les sphingolipides semblent également jouer un rôle dans l'interaction de la défensine d'insecte drosomycine avec ses espèces cibles. Chez le champignon *N. crassa*, le mutant *MUT16*, proposant des profils en sphingolipides réellement différents de la souche sauvage, est moins sensible aux défensines de plantes (Ferket *et al.*, 2003) mais également à la drosomycine (Gao & Zhu, 2008). À la suite de ces interactions lipidiques, les défensines peuvent être internalisées par les cellules fongiques ou demeurer de façon extracellulaire.

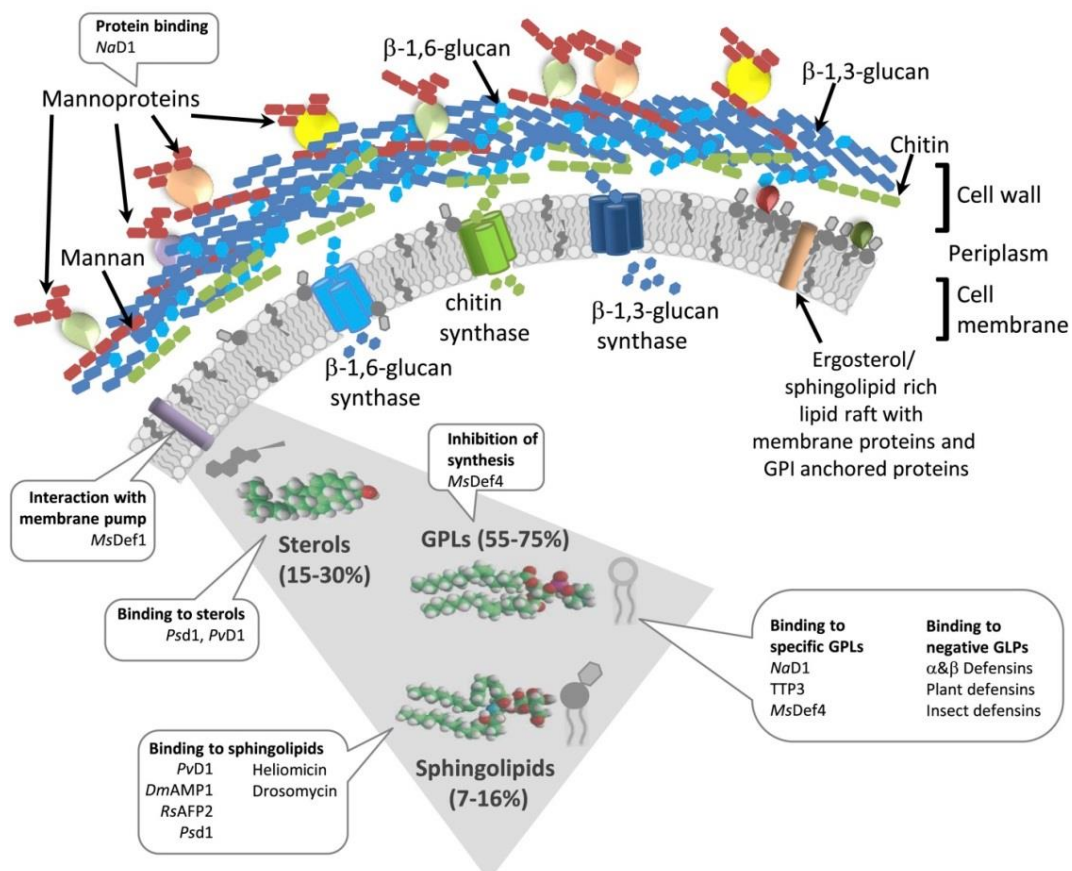


Figure 12. Résumé des partenaires membranaires connus pour les défensines CSαβ antifongiques

La défensine de plante NaD1 est la seule défensine interagissant avec les mannoprotéines, composants de la paroi cellulaire. Les défensines d'insectes ou de plantes peuvent interagir avec des stérols, des sphingolipides ou des glycérophospholipides (GPLs). Illustration issue de Rautenbach *et al.*, 2016. Copyright Elsevier.

3.3. Internalisation des défenses antifongiques

Plusieurs défenses ont démontré une aptitude à être internalisées malgré des partenaires membranaires différents. Le peptide MtDef4, actif contre les champignons filamenteux *F. graminearum* et *N. crassa*, a été identifié intracellulairement par microscopie électronique en transmission (MET) et microscopie confocale haute résolution (Sagaram *et al.*, 2013 ; El-Mounadi *et al.*, 2016). Les processus d'interaction de MtDef4 avec le phospholipide PA et son internalisation sont gouvernés par la présence dans sa séquence en acides aminés d'un motif RGFRRR (au niveau du nœud γ) (Sagaram *et al.*, 2011, 2013). La défense inhibe la croissance de ces deux espèces fongiques mais les mécanismes de transport à travers la membrane plasmique et les cibles intracellulaires diffèrent entre ces deux champignons. La perméabilisation de la membrane plasmique est nécessaire pour l'activité antifongique de MtDef4 chez *F. graminearum*, mais pas dans le cas de *N. crassa*. Il a également été démontré que l'internalisation de la défense chez *N. crassa* avait lieu par endocytose (Figure 13A) tandis que MtDef4 était internalisée de façon autonome chez *F. graminearum* (Figure 13B). Chez *N. crassa*, MtDef4 est ensuite localisée au niveau de vésicules intracellulaires (Figure 13C) mais sa cible intracellulaire reste à identifier chez *F. graminearum* (El-Mounadi *et al.*, 2016).

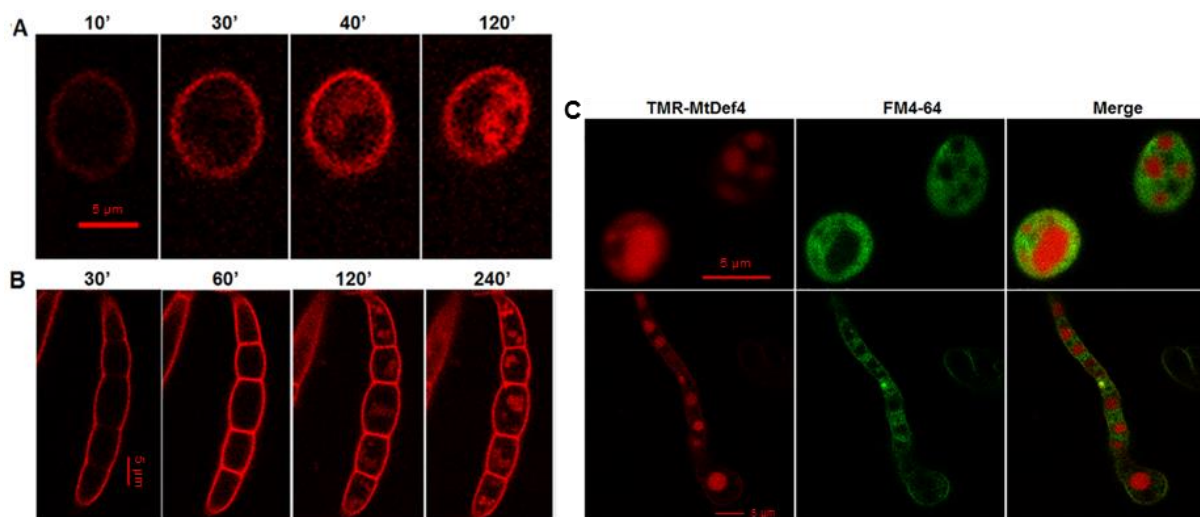


Figure 13. Internalisation de la défense MtDef4 chez les champignons *N. crassa* et *F. graminearum*

Analyses par microscopie confocale de la défense MtDef4 conjuguée au fluorophore TMR (rouge) et du marqueur d'endocytose FM4-64 (vert). Acquisition à plusieurs intervalles de temps (en minutes) dans des spores de (A) *N. crassa* et (B) *F. graminearum*. Co-marquage après 3 heures d'incubation dans des spores et des hyphes de *N. crassa* (C). Images adaptées de El-Mounadi *et al.*, 2016. Copyright 2016 The Authors Molecular Microbiology.

La défensine Psd1 interagit avec les glucosylcéramides et l'ergostérol (Erg), principal stérol présent exclusivement dans la membrane fongique (Gonçalves *et al.*, 2012). En effet, les interactions du peptide ont été étudiées par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et par résonance plasmonique de surface (SPR) en employant des micelles ou des vésicules composées de lipides de différentes origines (PC, GlcCer_{F. solani}, GlcCer_{soja}, Erg, cholestérol) (de Medeiros *et al.*, 2010, 2014). Psd1 a démontré une forte affinité pour les GlcCer_{F. solani} au contraire des GlcCer_{soja}, explicable par les différences structurales entre ces deux GlcCer et notamment l'absence du groupe 9-méthyle chez les GlcCer_{soja}. L'utilisation d'un mutant Δgcs chez *C. albicans* a révélé que cette interaction avec les GlcCer était essentielle pour l'internalisation du peptide mais pas pour l'activité antifongique. Une augmentation de la réponse SPR après l'incorporation d'ergostérol dans les vésicules a permis de désigner l'ergostérol comme autre partenaire membranaire de la défensine Psd1. (de Medeiros *et al.*, 2014).

Psd1 ne reste pas ancré sur la membrane plasmique et cible intracellulairement la cycline F, protéine nucléaire régulatrice du cycle cellulaire. La défensine bloquerait notamment les rôles de la cycline F dans les phases S à G2 du cycle cellulaire. Cette interaction a été confirmée chez deux espèces fongiques *N. crassa* et *F. solani* (Figure 14) suggérant un mécanisme d'action conservé parmi différents champignons (Lobo *et al.*, 2007).

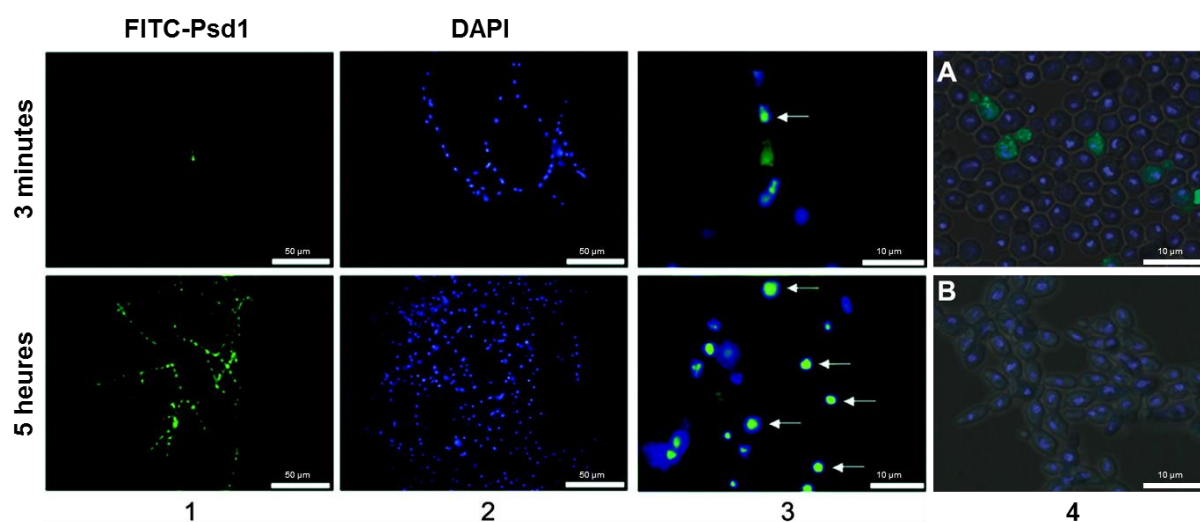


Figure 14. Internalisation de la défensine Psd1 chez les champignons *F. solani* et *C. albicans*

(1-3) Analyses par microscopie à fluorescence de la défensine conjuguée au fluorophore FITC (vert) et du marqueur d'ADN nucléaire DAPI (bleu). (1, 2) Acquisitions et (3) co-localisation après 3 min ou 5 h d'incubation dans des hyphes de *F. solani*. Illustrations adaptées Lobo *et al.*, 2007. Copyright American Chemical Society.

(4) Analyses par microscopie confocale de la défensine conjuguée au fluorophore FITC (vert) et du marqueur d'ADN nucléaire DAPI (bleu). Acquisition dans des cellules de (A) *C. albicans* et (B) du mutant associé Δgcs .

Illustrations adaptées de Medeiros *et al.*, 2014. Copyright Elsevier.

À la suite de l'interaction avec les mannoprotéines de la paroi cellulaire, la défensine NaD1 forme des dimères se liant solidement aux phospholipides PI(4,5)P₂ de la membrane plasmique puis constitue rapidement des oligomères NaD1-lipide (Poon *et al.*, 2014). Cette liaison est modulée par un motif SKILRR dans la séquence en acides aminés de la défensine (Bleackley *et al.*, 2016). Le mécanisme par lequel NaD1 passe de la paroi cellulaire à la membrane plasmique, et en particulier vers le feuillet interne contenant les PI(4,5)P₂, n'a pour l'instant pas été identifié. La défensine NaD1 entre ensuite dans le cytoplasme (Figure 15) pour interagir avec des cibles intracellulaires, déclenchant la production de ROS, la perméabilisation de la membrane plasmique et la mort cellulaire (van der Weerden *et al.*, 2008 ; Hayes *et al.*, 2013). La protéine de la membrane plasmique Agp2p, régulant notamment le transport des polyamines (Aouida *et al.*, 2005), a été identifiée comme un facteur régulant l'efficacité de la défensine. Des mutants $\Delta Agp2$ chez la levure *S. cerevisiae* deviennent plus résistants à NaD1 et démontrent également une internalisation réduite de la défensine (Bleackley *et al.*, 2014). Des études sont encore nécessaires pour compléter les connaissances actuelles sur les mécanismes d'internalisation et d'action de ces trois défensines.

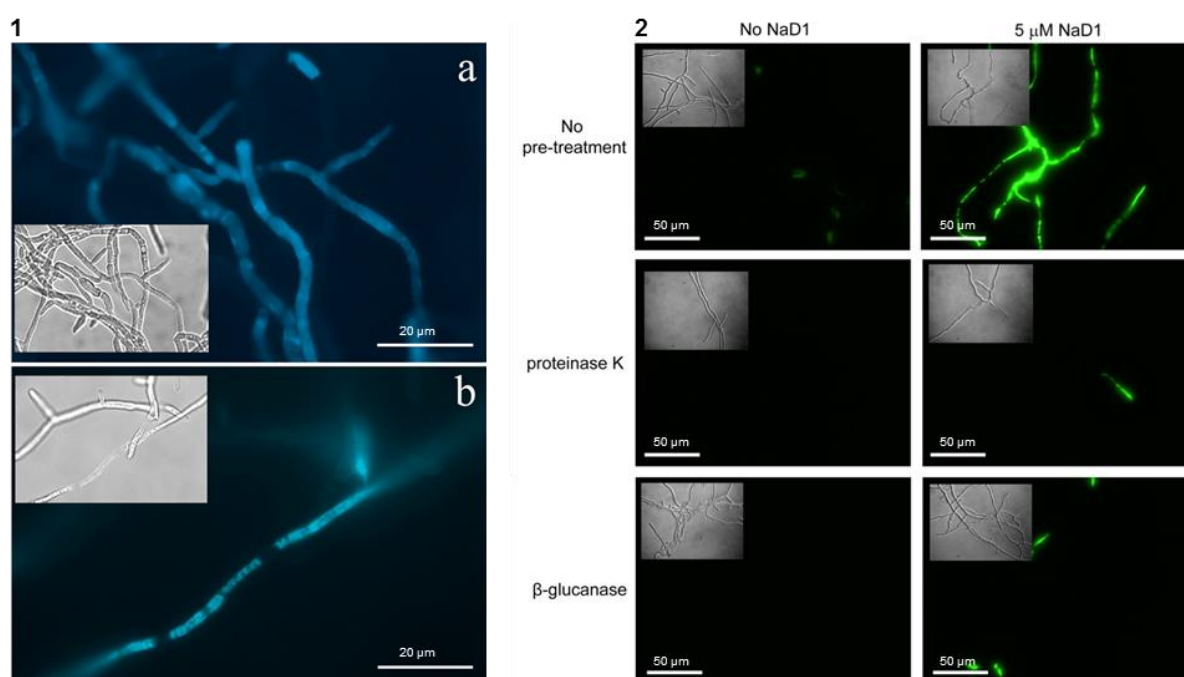


Figure 15. Internalisation de la défensine NaD1 et perméabilisation membranaire chez le champignon *F. oxysporum*

Analyses par microscopie à fluorescence de la défensine conjuguée au bimaane (bleu) et du marqueur de perméabilisation membranaire SYTOX (vert). (1) Acquisition après (a) 30 min et (b) 6 h d'incubation dans des hyphes de *F. oxysporum*. Images adaptées de Weerden *et al.*, 2008. Copyright American Society for Biochemistry & Molecular Biology.

(2) Évaluation de la perméabilisation des hyphes de *F. oxysporum* sans et avec suppression des différentes couches de la paroi cellulaire. Images adaptées de Weerden *et al.*, 2010. Copyright American Society for Biochemistry & Molecular Biology.

3.4. Mécanismes induits par les défenses antifongiques

Suite à leur interaction avec un partenaire membranaire ou à leur internalisation dans la cellule fongique, les défenses antifongiques peuvent déclencher certains mécanismes compromettant le fonctionnement ou l'intégrité cellulaire du champignon (Figure 16).

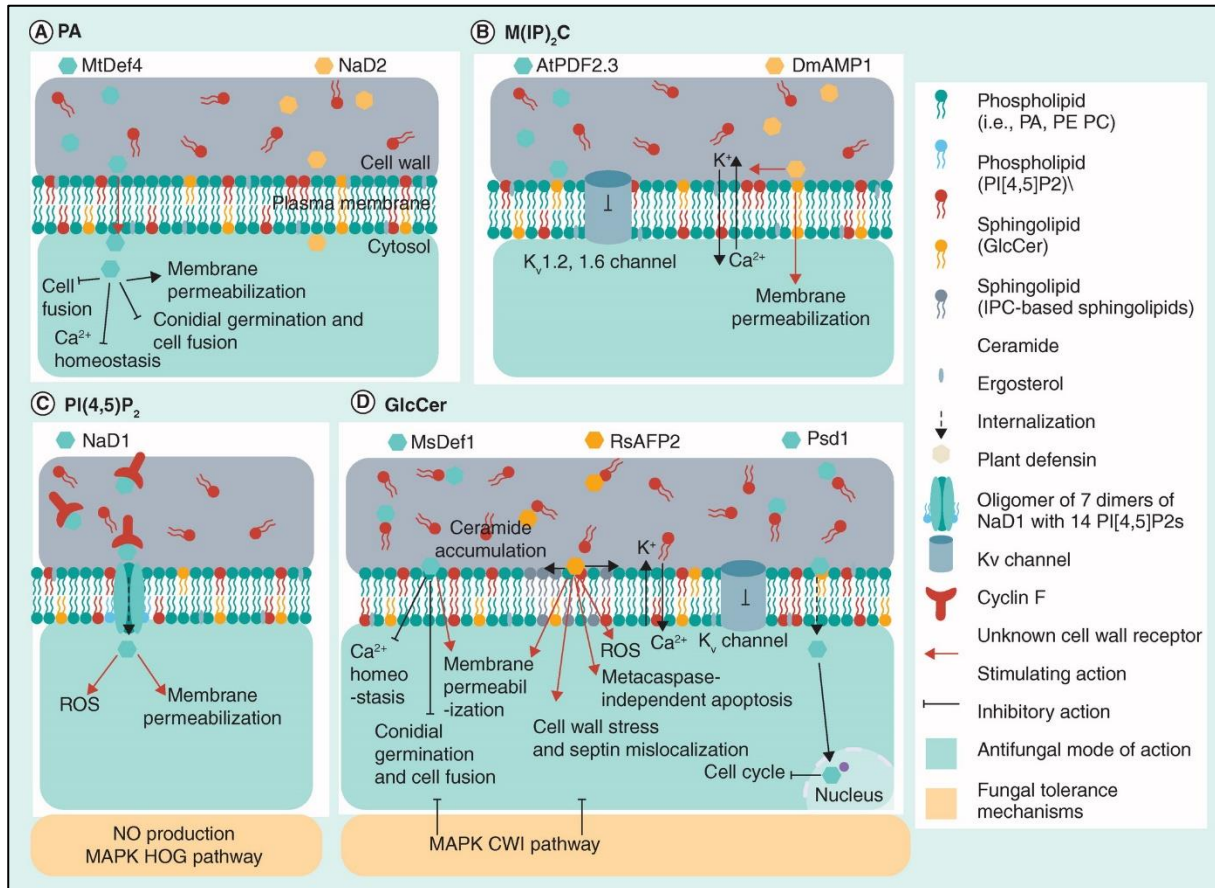


Figure 16. Résumé des informations mécanistiques connues pour les défenses antifongiques de plantes

Les défenses sont classées selon leur partenaire membranaire. (A) PA : Acide phosphatidique; (B) M(IP)₂C: Mannose-di-inositol-phosphoryle-céramide; (C) PI(4,5)P₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; (D) GlcCer: Glucosylcéramide. Illustration adaptée de Cools *et al.*, 2017. Copyright Future Medicine Ltd.

3.4.1. Dérivés réactifs de l'oxygène

Ces espèces chimiques oxygénées connues sous le terme « Reactive Oxygen Species » (ROS) regroupent des radicaux libres, des ions oxygénés et des peroxydes chimiquement très réactifs. Plusieurs défenses de plantes dont RsAFP2 (Aerts *et al.*, 2007), NaD1 (van der Weerden *et al.*, 2008) et HsAFP1 (Aerts *et al.*, 2011) induisent la production de ces ROS. À fortes concentrations, ces espèces oxygénées peuvent endommager l'ADN, l'ARN et le matériel protéique intracellulaire (Perrone *et al.*, 2008). La production de ROS est également l'un des marqueurs de l'apoptose, processus de mort cellulaire programmée préservant l'intégrité de la membrane plasmique tout en dégradant le contenu intracellulaire de façon

organisée (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2010). Ce mécanisme est notamment induit par les défensines RsAFP2 (Aerts *et al.*, 2009) et HsAFP1 (Aerts *et al.*, 2011).

À l'inverse, la nécrose est un phénomène non programmé de mort cellulaire caractérisé par une perte de l'intégrité membranaire libérant de façon incontrôlée le contenu intracellulaire (Eisenberg *et al.*, 2010). Ce processus n'est pas spécifique pour les défensines de plantes mais plutôt considéré comme un effet secondaire d'un traitement à forte concentration ou après un long temps d'incubation (Thevissen *et al.*, 1996).

3.4.2. Perméabilisation de la membrane plasmique

Plusieurs défensines de plantes présentent un effet sur l'intégrité membranaire du champignon traité. Chez *N. crassa*, la perméabilisation membranaire induite par les défensines RsAFP2 et DmAPM1 était biphasique, dépendant de la concentration en défensine. À des concentrations élevées (10 à 40 μM), une forte perméabilisation a été détectée en SYTOX Green. L'ajout de cations dans le milieu a permis de fortement diminuer cet effet suggérant que la perméabilisation était reliée à une interaction directe peptide-phospholipide. À des concentrations faibles (0,1 à 1 μM), corrélant avec l'inhibition de la croissance fongique, la perméabilisation est réduite et indépendante de la cationicité du milieu (Thevissen *et al.*, 1999). Chez *F. graminearum*, les défensines MsDef1 et MtDef4 induisent une perméabilisation de la membrane plasmique. Des études cinétiques ont par la suite révélé que la défensine MtDef4 était plus efficace que la défensine MsDef1 en termes de perméabilisation (Sagaram *et al.*, 2011). Enfin, la défensine NaD1 perméabilise la membrane du champignon *F. oxysporum* selon une interaction spécifique avec la paroi cellulaire (van der Weerden *et al.*, 2010).

3.4.3. Interférence dans l'homéostasie des cations

Les défensines RsAFP2 et DmAMP1 provoquent un rapide afflux de Ca^{2+} et une perte de K^+ dans les hyphes du champignon *N. crassa* (Thevissen *et al.*, 1996, 1999). Il est envisagé que ces peptides perturbent le gradient Ca^{2+} le long de la membrane fongique, facteur essentiel pour la croissance polarisée des extrémités mycéliennes. Le mutant V39R de la défensine RsAFP2 est également associé à un afflux de Ca^{2+} dans les hyphes du champignon *F. culmorum*, corrélé avec une activité antifongique plus importante que pour la défensine native (Samblanx *et al.*, 1997).

3.4.4. Mécanismes de tolérance des champignons

Afin de surmonter des stress environnementaux tel que l'ajout d'une molécule antifongique, les champignons comme la plupart des cellules eucaryotes s'appuient sur la rapide transduction de signaux à travers les voies MAPK. De l'anglais « Mitogen-Activated Protein Kinases », ces voies regroupent un ensemble de kinases conservées, activées par phosphorylation et jouant des rôles importants dans la tolérance aux défensines de plantes. Parmi les nombreuses MAPK disponibles, les voies de l'osmorégulation « High-Osmolarity Glycerol » (HOG) et l'intégrité de la paroi cellulaire « Cell Wall Integrity » (CWI) sont particulièrement importantes chez les champignons en réponse à un stress osmotique, oxydatif ou pariétal (Hayes *et al.*, 2014).

La tolérance aux défensines de plantes RsAFP2, DmAMP1 et MsDef1 implique la voie CWI chez *C. albicans*, *S. cerevisiae* et *F. graminearum*. Dans le cas de RsAFP2, la défensine interagit avec les glucosylcéramides dans la paroi cellulaire entraînant des anomalies dans la structure pariétale et la structure cellulaire (Thevissen *et al.*, 2012). La MAPK CaMkc1 est impliquée dans la protection de la levure *C. albicans* contre les effets toxiques de la défensine RsAFP2. La MAPK FgMgv, homologue de CaMkc1, est impliquée dans la protection du champignon filamenteux *F. graminearum* contre RsAFP2 et MsDef1 (Ramamoorthy *et al.*, 2007b).

Contrairement aux défensines de plantes RsAFP2 et MsDef1, la défensine NaD1 active la voie HOG (CaHog1) chez *C. albicans* (Hayes *et al.*, 2013). Ce peptide agit à travers un mécanisme en trois étapes : liaison à la paroi cellulaire, mouvement jusqu'à la membrane plasmique et entrée dans le cytoplasme (van der Weerden *et al.*, 2008). L'activation de la voie CaHog1 est requise pour la survie de la levure *C. albicans* en présence d'une faible concentration de NaD1.

PROJET DE THESE

La lutte contre les champignons phytopathogènes, bio-agresseurs des plantes cultivées, fait largement appel aux produits phytosanitaires. Néanmoins, le contrôle des maladies fongiques par des moyens chimiques doit faire face à des enjeux importants tels que le renforcement de la réglementation et l'émergence de résistances vis-à-vis des fongicides. L'ensemble de ces points remet en cause l'efficacité des molécules et réduit le portefeuille de produits à usage agricole disponibles. Les acteurs de l'agriculture de demain se doivent ainsi de promouvoir des méthodes de protection des cultures durables et respectueuses de l'environnement. Les réponses à ce défi majeur intègrent notamment la recherche de nouvelles solutions dérivées de molécules naturelles et présentant des modes d'action innovants. Démontrant une grande diversité de structures et d'activités biologiques, les peptides antimicrobiens (PAMs) peuvent proposer une alternative aux produits existants. Indifféremment de leurs origines, végétale ou animale, plusieurs approches ont été développées pour adapter ces peptides à faible toxicité en solution contre des pathogènes d'intérêt thérapeutique et/ou phytosanitaire (de Souza Cândido *et al.*, 2014 ; Yi *et al.*, 2014). Plusieurs molécules basées sur les PAMs sont actuellement en phase de développement clinique et présentent par exemple des solutions contre les infections de la peau ou des voies respiratoires (Naafs, 2018).

Parmi les entreprises étudiant les PAMs à des fins thérapeutiques, EntoMed S.A. fut la première société de biotechnologie à développer des molécules pour lutter contre les infections nosocomiales systémiques – Fusariose et Aspergillose - en utilisant des substances naturelles produites chez les insectes (Andrès & Dimarcq, 2004). Dans l'objectif de traiter les champignons invasifs affectant les patients immunodéprimés, EntoMed S.A. s'est appuyée sur les défensines naturelles héliomicine et ARD1, isolées respectivement des papillons *Heliothis virescens* et *Archaeoprepona demophon*. Le peptide ETD151, analogue de 44 acides aminés, a été développé en laboratoire en modifiant la séquence en acide aminés du peptide ARD1 (Asn19Arg) (Figure 17).

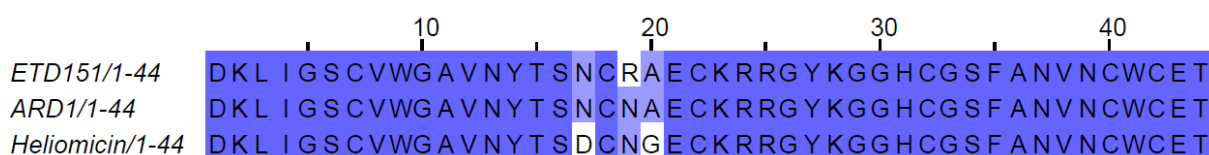


Figure 17. Alignement des séquences des défensines ETD151, ARD1 et héliomicine

Alignement, à l'aide du programme Clustal (www.clustal.org), des séquences de la défensine ETD151 avec les défensines ARD1 et héliomicine ayant servi à son optimisation. Les résidus conservés sont surlignés en bleu.

Cette modification d'un acide aminé neutre en un acide aminé basique a permis de potentialiser l'activité du peptide ETD151 par un facteur 10 comparé à ARD1 et par un facteur 100 par rapport à l'héliomicine. Possédant une structure tridimensionnelle similaire à celle de l'héliomicine et de ARD1 (Landon *et al.*, 2004), le peptide ETD151 est également de nature amphiphile et offre un large spectre d'activité antifongique. La modification Asn19Arg a augmenté la charge positive au niveau du pôle cationique (hélice α et partie C-terminale) et amélioré l'activité *in vitro* d'ETD151 sur les pathogènes *C. albicans*, *C. neoformans* et *A. fumigatus* (Landon *et al.*, 2004). Sur un modèle de souris, ETD151 s'est montré particulièrement efficace contre *C. albicans* et *A. fumigatus* en comparaison de certains antifongiques de référence. En perfusion intraveineuse continue chez la souris, ce variant de défensine n'a également pas affiché de toxicité pour des doses jusqu'à 600 mg/kg (Andrès, 2012). Malgré un réel potentiel pour un développement thérapeutique et la production dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* d'un kilogramme de peptide, la société EntoMed S.A. a décidé en 2005 de stopper les études précliniques programmées.

En 2014, fort de (i) l'activité prometteuse observée sur de nombreux champignons filamenteux impactant la santé animale, humaine et végétale, (ii) l'absence de toxicité *in vitro* et *in vivo* sur de nombreux modèles de cellules eucaryotes et des modèles animaux, (iii) l'augmentation croissante de la résistance aux traitements phytosanitaires conventionnels, et (iv) du besoin pressant de trouver de nouvelles alternatives pour le contrôle des maladies fongiques, la société Bayer CropScience a entrepris l'étude de l'efficacité du peptide ETD151 sur une série de souches de champignons phytopathogènes (données confidentielles Bayer). Les résultats prometteurs obtenus ont permis de mettre en place plusieurs projets d'études sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la relation existante entre le peptide ETD151 et les champignons cibles. Sur la base de son spectre d'activité, le projet de thèse se focalise sur le champignon modèle *Botrytis cinerea*, espèce phytopathogène capable d'infecter plus de 230 espèces de plantes et d'engendrer des dégâts considérables sur les cultures d'intérêt agronomique.

L'objectif général de cette thèse vise à améliorer notre compréhension du mécanisme d'action du peptide ETD151 sur le champignon *B. cinerea* et ainsi apporter des éléments mécanistiques utiles à la recherche de nouvelles solutions antifongiques novatrices. Les recherches ont été accomplies dans le cadre d'un partenariat entre deux laboratoires publics (Institut pour l'Avancée des Biosciences, Centre de Recherche UGA, Inserm U1209, CNRS UMR5309, La Tronche ; Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Orléans) et un laboratoire industriel (Centre de Recherche de La Dargoire, Bayer CropScience, Lyon). Les expertises complémentaires proposées par ces laboratoires ont permis d'intégrer aux travaux des approches scientifiques pluridisciplinaires (biochimie des peptides, protéomique, sphingolipidomique, production de protéine recombinante, études enzymatiques, microscopie à fluorescence et confocale, RMN).

Plusieurs étapes ont été définies dans les travaux de recherche :

En amont de la thèse, une approche par MALDI-MS avait tout d'abord mis en évidence des empreintes (peptidiques et protéiques) différentielles de l'effet du peptide ETD151 sur le champignon *B. cinerea*. Sur la base de ces résultats, des études protéomiques ciblées en bottom-up LC-ESI-MS/MS ont été réalisées dans le but d'identifier des protéines ou des voies métaboliques impliquées de façon primaire ou secondaire dans le mécanisme d'action du peptide ETD151.

Sur la base des travaux réalisés sur la défensine héliomicine, des investigations ont été menées afin de confirmer le rôle des glucosylcéramides dans l'activité du peptide antifongique. Des études ont été ensuite entreprises pour identifier ce partenaire membranaire chez *B. cinerea* et expliquer la sensibilité de ce champignon au peptide ETD151. Afin d'étudier par biologie structurale RMN les interactions au niveau atomique entre le peptide et ces sphingolipides, les glucosylcéramides ont été caractérisés structurellement à partir d'extraits lipidiques de *B. cinerea*, et l'expression hétérologue du peptide ETD151 marquée ¹⁵N a été conduite chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Enfin, l'effet du peptide ETD151 sur la morphologie du champignon *B. cinerea* a été évalué par microscopie en présence de marqueurs fluorescents. Ces observations, aidées des données obtenues en protéomique, ont été interprétées afin de mettre en place des hypothèses concernant le mécanisme d'action du peptide antifongique. Une approche de marquage du peptide par un fluorophore a également été utilisée dans le but de localiser le peptide ETD151

au niveau membranaire et de résoudre la question de son internalisation par le champignon *B. cinerea*.

MATERIELS ET METHODES

Avant-propos

Deux souches du champignon *Botrytis cinerea* (B047 et B05.10) ont été mises à disposition par le Centre de Recherche de La Dargoire (CRLD, Bayer CropScience, Lyon) et utilisées durant ce projet. L'identifiant B047 est attribué à une population de spores isolée à partir de cultures de cornichons en champ en 2001 (données internes Bayer CropScience) tandis que B05.10 désigne une souche provenant du laboratoire du Dr Paul Tudzynski (Institut für Botanik, Münster, Allemagne) (Büttner *et al.*, 1994 ; Quidde *et al.*, 1998). Le peptide antifongique ETD151 a été fourni par le Dr Philippe Bulet, propriétaire de cette molécule, pour l'accomplissement des travaux de thèse. L'ensemble des manipulations a été réalisé en respectant les conditions de sécurité en vigueur dans les laboratoires de MassOmic (plateforme du BioPark d'Archamps) et du CRLD. Les cultures cellulaires nécessitant des conditions stériles ont été effectuées sous poste de sécurité microbiologique (PSM de type II) à l'aide de matériel à usage unique ou préalablement stérilisé. Les milieux et solutions utilisés ont été stérilisés dans des conditions tenant compte de leur composition, soit par autoclave, soit par filtration sur membrane acétate de cellulose exempte de tensio-actif (SFCA) de 0,2 µm (Unité Nalgene Rapid-Flow, Thermo Fisher Scientific). La majorité des réactifs et solvants employés fréquemment durant ce projet est commercialisée par la société Sigma-Aldrich. Dans le cas contraire, l'origine du produit sera précisée.

Matériel biologique

La souche B047 est conservée sous la forme de cryotubes stockés dans l'azote liquide et contenant une suspension de spores calibrée à $1,5 \cdot 10^7$ spores par millilitre (sp/mL) dans 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO). Pour chaque expérience, un cryotube a été décongelé et son contenu dilué dans de l'eau Milli-Q (Merck Millipore) stérile pour atteindre une concentration finale de $1,5 \cdot 10^5$ sp/mL dans 0,1 % de DMSO. Afin d'obtenir des cultures fongiques fraîches, 150 μ L de la suspension de spores ont été étalés en boîte de Petri (Corning) sur milieu gélose dextrosée à la pomme de terre 39 g/L (PDA, Oxoid) avant incubation pendant 7 jours à 21 ± 1 °C et à l'obscurité.

La souche B05.10 est disponible sous la forme de « plugs » conservés stérilement dans de l'eau Milli-Q et à 4 °C. Une culture a été mise en route en déposant un plug (environ 0,5 cm²) sur milieu PDA avant incubation pendant 10 à 12 jours à 21 ± 1 °C et sous lumière ultraviolet (UV, lampe Vilber Lourmat 15 W 365 nm). Une culture de B05.10 peut être entretenue par repiquage hebdomadaire (cinq au maximum) à partir d'un plug prélevé sur une boîte de la semaine précédente. La souche B047 est également facilement cultivable à partir de plugs conservés à 4 °C et déposés sur milieu PDA.

À l'issue de la phase d'incubation (ou sporulation), les spores fraîches ont été récoltées en ajoutant de l'eau Milli-Q stérile, en grattant la surface mycélienne à l'aide d'un grattoir cellulaire (Cell Scraper, Corning) et en filtrant les spores sur un tamis cellulaire (Cell Strainer Nylon 100 μ m, Corning) pour éliminer les débris mycéliens. Après double comptage des spores sur une cellule de Malassez ou une cellule de Thoma, une suspension finale de spores a été calibrée selon la concentration voulue en sp/mL dans un milieu adapté au test préparé. La composition des milieux utilisés pour la culture du champignon *B. cinerea* est détaillée en Annexe 2.

1. Études protéomiques

Cette section complète les informations présentées dans le Chapitre I.

1.1. Pré-purification du peptide ETD151

Un échantillon d'ETD151 conservé en solution physiologique a été dessalé sur cartouches d'extraction en phase solide (SPE) en phase inverse (Sep-Pak C₁₈ Classic 360 mg, 55-105 µm, Waters). Trois cartouches ont été associées en série pour augmenter la surface d'échange et purifier 20-30 mg de peptide. En respectant les recommandations du fournisseur, la phase C₁₈ a été solvatée progressivement par 20 mL de méthanol (MeOH) pur puis conditionnée par 20 mL d'une solution d'eau et d'acide trifluoroacétique (eau/TFA 0,1 % final). Préalablement acidifié à pH 3 par ajout d'acide acétique, l'échantillon a été chargé sur la cartouche avant élimination des sels par lavage avec 20 mL d'eau/TFA 0,1 %. Le peptide a été élué dans 10 mL d'une solution d'acétonitrile préparée en milieu acide (ACN 60 %/TFA 0,1 % final). L'éluat a été lyophilisé par centrifugation sous vide (CentriVac Vacuum Concentrator, Labconco). La poudre obtenue a été stockée à sec au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.

1.2. Détermination de la concentration inhibitrice médiane

Les tests d'activité antifongique en présence du peptide ETD151 ont été effectués sur le champignon *B. cinerea* en microplaques 96 puits stériles (TPP). Une gamme d'ETD151 a été préparée dans de l'eau Milli-Q stérile par dilution en série à partir d'un stock à 250 micromolaire (µM) et selon un facteur 2. Pour évaluer l'effet sur la germination des spores, les puits ont étéensemencés avec 135 µL d'une suspension fraîche de spores à 500 sp/mL en milieu minimum (Tanaka, 1965 ; Ou, 1985) avant ajout immédiat de 15 µL de la gamme d'ETD151, 25 à 0,049 µM final. Après agitation, les microplaques ont été incubées selon les conditions détaillées précédemment (voir Matériels et Méthodes, p. 64). Pour évaluer l'effet sur la croissance (ou élongation) mycélienne, les puits ont étéensemencés tel que précédemment par une suspension fraîche de spores. L'ajout du peptide a été effectué après trois jours d'incubation, permettant la croissance préalable de mycélium. Le suivi de l'effet du peptide ETD151 sur le champignon cible a été réalisé quotidiennement par mesure de l'absorbance (ou densité optique, DO) à 630 nm (Microplate Reader ELx808, BioTek). L'effet sur la germination des spores ou sur l'élongation du mycélium, traitement respectivement à J₀ ou J₃, a été évalué au jour J par comparaison avec un contrôle non traité (CTL).

Le pourcentage d'inhibition a été calculé à partir des mesures de DO de la façon suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \left[1 - \frac{(DO_{J_{mesure}} - DO_{J_{traitement}})_{ETD}}{(DO_{J_{mesure}} - DO_{J_{traitement}})_{CTL}} \right] \times 100$$

La courbe inhibition-dose a été dessinée dans l'extension de Microsoft Excel XLfit (v5.4.08, www.idbs.com) permettant d'ajuster le modèle « Dose response one site – 205 » et de déterminer la concentration inhibitrice médiane (CI₅₀).

1.3. Traitement du mycélium pour les analyses protéomiques

Une microplaque a été préparée par distribution de 135 µL de suspension fraîche de spores à 500 sp/mL dans six rangées de 10 puits, une rangée par condition de traitement (Figure 18). Après trois jours d'incubation à 21 ± 1 °C (voir Matériels et Méthodes, p. 64), 15 µL d'eau Milli-Q stérile ont été ajoutés à la première rangée comme contrôle non traité. Les cinq autres rangées ont été successivement traitées avec 15 µL d'une gamme d'ETD151 (3,12 à 0,19 µM final). La microplaque a été à nouveau incubée 24 h. Chaque expérience a été suivie par mesure de la DO à 630 nm.

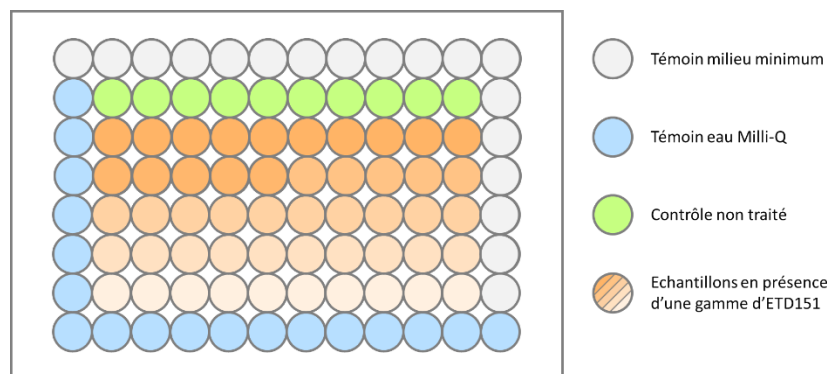


Figure 18. Plan des microplaques de mycélium pour les analyses protéomiques
Une rangée de 10 puits a été traitée avec une concentration identique en ETD151, de 3,12 µM (●) à 0,19 µM final (○).

1.4. Extraction protéique

Pour chaque microplaque, le contenu des 60 puits a été collecté par pipetage manuel. Un cône stérile a été utilisé pour gratter les parois des puits dans l'éventualité où le mycélium restait fixé à celles-ci. Chaque rangée a été regroupée dans un tube Eppendorf (Safe-Lock 1,5 mL) maintenu dans la glace pour réduire la protéolyse. Les échantillons ont été centrifugés 4 min à 15 700 x g et à 4 °C pour séparer le culot mycélien du surnageant.

1.5. Traitement du culot

Le culot a été lavé deux fois par pipetage aller-retour avec 1 mL d'eau Milli-Q stérile avant ajout de 1 mL d'éthanol (EtOH) à 70 % et conservation pendant une nuit à -80 °C. En utilisant des billes en oxyde de zirconium de 0,5 mm, le mycélium a été broyé dans des tubes de 2 mL pendant 10 min à 30 hertz (Mill-Mix 20, Domel). Après centrifugation 4 min à 15 700 x g et à 4 °C, chaque culot a été collecté et séché sous vide (CentriVap Vacuum Concentrator, Labconco). Les protéines ont été extraites du culot sec par incubation en présence d'acide acétique à 2 M dans une solution ACN 50 %, sous légère agitation pendant 4 h et à 4 °C. Les échantillons ont été centrifugés pendant 4 min à 15 700 x g et à 4 °C afin de récupérer les surnageants protéiques, ensuite conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

1.6. Analyses par spectrométrie de masse à désorption laser assistée par matrice

1.6.1. Préparation des échantillons

Les analyses effectuées par spectrométrie de masse à désorption laser assistée par matrice (MALDI-MS) ont nécessité en amont la préparation d'une solution de matrice fraîche par ajout jusqu'à saturation de quelques milligrammes d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (4-HCCA) dans 1 mL de solution ACN 50 %/TFA 2,5 %. Un aliquot de 0,5 μ L de l'échantillon à analyser a été déposé sur une cible MALDI (MSP 96 target polished steel, Bruker Daltonics) et immédiatement recouvert par 0,5 μ L de la matrice fraîche. Les dépôts dits « goutte séchée » ont été rapidement séchés sous un vide modéré avant analyse. L'instrument a été calibré en utilisant les kits « Protein Calibration Standard I » (ProtMix, Bruker Daltonics) et « Peptide Calibration Standard II » (PepMix, Bruker Daltonics) (Tableau 3).

1.6.2. Empreintes massiques par MALDI-MS

Les spectres de masse ont été acquis sur un spectromètre AutoFlex III Smartbeam II (Bruker Daltonics, Allemagne) à l'aide du logiciel FlexControl (v3.4, Bruker Daltonics) en mode linéaire positif. L'instrument a été programmé avec les paramètres suivants : laser de 200 Hz avec une atténuation de 40 %, tensions de 20 et 18,5 kV respectivement pour les sources 1 et 2, tensions de 9 et 1,82 kV respectivement pour la lentille et le détecteur linéaire, un délai d'extraction de 140 nanosecondes et un déclenchement de la détection à 600 Da.

Pour chaque dépôt, les spectres MALDI-MS ont été enregistrés sur une fenêtre masse/charge (m/z) 600 à 18 000, en additionnant deux séries de 1 000 tirs de lasers sur différentes positions du dépôt ciblé. Les données ont été traitées avec le logiciel FlexAnalysis (v3.4, Bruker Daltonics).

Tableau 3. Composition des kits « Protein Calibration Standard I » et « Peptide Calibration Standard II »
Sauf mention contraire, chaque composé est accompagné du rapport masse/charge (m/z) moyen de l'adduit $[M+H]^+$.

Protein Calibration Standard I		Peptide Calibration Standard II	
Protéine	m/z	Peptide	m/z
Insulin	5734,51	Bradykinin 1-7	757,86
Ubiquitin I	8565,76	Angiotensin II	1047,19
Cytochrom C	12360,97	Angiotensin I	1297,49
Myoglobin	16952,30	Substance P	1348,64
Cytochrom C $[M+2H]^{2+}$	6180,99	Bombesin	1620,86
Myoglobin $[M+2H]^{2+}$	8476,65	ACTH clip 1-17	2094,43
		ACTH clip 18-39	2466,68
		Somatostatin28	3149,57

1.7. Analyses protéomiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse par électrobulbation à haute résolution

La protéomique désigne l'analyse du protéome comme l'ensemble des protéines présentes dans une cellule, un tissu, un organe ou un organisme. C'est une étude dynamique qui s'attache à identifier et à caractériser des protéines extraites, mais également à définir leurs éventuelles modifications post-traductionnelles, leur localisation subcellulaire, leur rôle biologique ou encore les interactions protéines-protéines. Depuis 2000, la spectrométrie de masse (MS) est devenue la méthode de choix pour les études protéomiques (Wilkins *et al.*, 2007) grâce au développement des méthodes d'ionisations douces telles que la désorption laser assistée par matrice (MALDI) et l'électrobulbation (ESI). Les deux stratégies majeures en analyse protéomique sont les approches dites top-down et bottom-up. Dans le premier cas, les protéines sont analysées entières sans digestion préalable. Dans le second, l'approche requiert une étape de digestion enzymatique des protéines, généralement une trypsinolyse, avant l'analyse des produits de la digestion par LC-ESI-MS/MS (Heberle *et al.*, 2015).

1.7.1. Préparation des échantillons pour une approche de type bottom-up

Les protéines ont été digérées selon un protocole développé dans le service de MassOmics du BioPark d'Archamps (Masson *et al.*, 2018). Brièvement, les surnageants des extraits protéiques ont été évaporés sous vide avant resuspension par une légère agitation dans un tampon ammonium bicarbonate (ABC) 50 mM à pH 7,5 complété avec 0,1 % de tensioactif (*RapiGest SF*, Waters). Après ajout d'argon, les protéines ont été réduites avec du dithiothréitol (DTT) à 280 mM dans ABC pendant 30 min à l'obscurité et à 56 °C, puis alkylées avec du iodoacétamide (IAA) à 480 mM dans ABC pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante. La digestion a été effectuée par ajout de 0,5 µg de trypsine (0,1 µg/µL dans ABC, Promega) et agitation pendant 1 h à 37 °C. Un second ajout de 0,5 µg de trypsine a été réalisé avant incubation pendant la nuit à 37 °C. La protéolyse a été stoppée et le tensioactif clivé par acidification des échantillons avec 8 µL d'une solution ACN 20 %/TFA 10 % et incubation pendant 30 min à 37 °C. Les échantillons ont été centrifugés pendant 10 min à 15 700 x g et à température ambiante. Les produits issus de la trypsinolyse ont été transférés dans des tubes d'injection HPLC contenant 5 µL d'une solution ACN 2 %/TFA 0,1 %.

1.7.2. Analyses protéomiques par nanoLC-ESI-MS/MS

L'analyse protéomique a été réalisée par nano-chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem par électrobulbation (nanoLC-ESI-MS/MS) à haute résolution. L'ensemble des instruments, des logiciels, des colonnes chromatographiques et autres consommables a été fourni par la société Thermo Fisher Scientific. Les produits issus de la trypsinolyse ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance (UltiMate 3000 nanoflow HPLC) couplé à un spectromètre de masse à haute résolution (Q-Exactive Orbitrap), contrôlés par les logiciels Xcalibur (v2.2), Chromeleon Xpress (v6.80) et Thermo QExactive Tune (v2.5). La séparation nano-LC a été accomplie selon les travaux de Pisani *et al.* (2016) et de Masson *et al.* (2018). Brièvement, les produits de la trypsinolyse ont été pré-concentrés sur une pré-colonne de phase inverse (PepMap 100 C₁₈, 300 µm x 5 mm, 5 µm) pendant 6 min à un débit de 10 µL/min, puis séparés à un débit de 300 nL/min sur une colonne en phase inverse (Acclaim PepMap 100 C₁₈, 75 µm x 250 mm, 3 µm) maintenue à 35 °C.

Les peptides ont été élués selon un gradient linéaire à plusieurs paliers, de 2 à 32 % en 94 min et de 32 à 65 % d'ACN en 5 min en présence d'acide formique à 0,1 % final. Les analyses par spectrométrie de masse ont été effectuées en mode positif et les spectres ont été collectés

par une méthode d'acquisition de données dépendantes (data-dependent acquisition, DDA). L'instrument a acquis les spectres MS en balayant sur une large gamme de masse, de 380 à 2 000 m/z (résolution à 70 000, contrôle automatique du gain CAG à $3 \cdot 10^6$, temps maximum d'injection des ions TI à 200 ms). Après chaque cycle de balayage MS, les 10 ions peptidiques les plus intenses ont été fragmentés (MS/MS) chacun à leur tour (résolution à 17 500, CAG à $2 \cdot 10^5$, TI à 100 ms, seuil d'intensité à $4 \cdot 10^4$, exclusion des ions peptidiques dont la charge n'a pu être déterminée, énergie de collision normalisée EC à 27). Les ions parents ont été exclus de la MS/MS pour les 15 secondes suivantes afin d'éviter leur intégration dans les prochains cycles de fragmentation MS/MS.

2. Analyse des sphingolipides du champignon *B. cinerea*

2.1. Préparation de la biomasse mycélienne

Une suspension fraîche de spores a été préparée pour la souche B05.10 afin d'ensemencer 100 mL de milieu minimum à 10^5 sp/mL final. Chaque culture en erlenmeyer de 250 mL a été incubée sous agitation pendant 24 à 72 h à 21 °C. La biomasse mycélienne a été culottée par centrifugation des milieux de culture pendant 10 min à 3 000 x g. Les culots ont été rapidement congelés dans l'azote liquide et lyophilisés (Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ). Le poids sec en mycélium a été déterminé par pesée.

2.2. Extraction des sphingolipides de *B. cinerea*

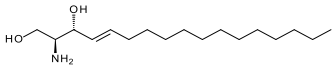
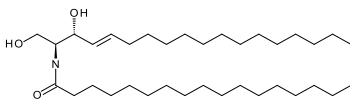
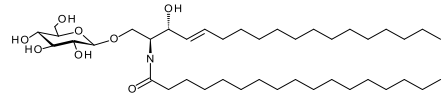
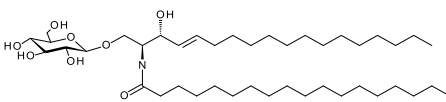
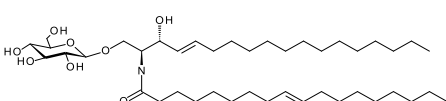
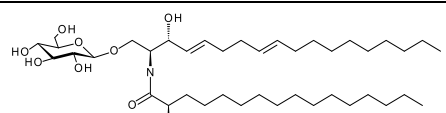
Notre protocole d'extraction a été adapté des travaux de Singh & Del Poeta (2016) (Figure 19). La première étape dite « Mandala » (Hanson & Lester, 1980 ; Mandala *et al.*, 1995) a été réalisée en reprenant 5 à 100 mg de mycélium sec dans 5 mL de tampon EtOH : eau Milli-Q : éther diéthylique (Et₂O) : pyridine : ammoniacque (NH₄OH) 4,2 M (15 : 15 : 5 : 1 : 0,018 ; v/v). La solution a été complétée avec 15 µL d'un mélange à 1 mM de standards lipidiques (Tableau 4). Les échantillons ont été agités et maintenus 1 h dans un bain-marie à 60 °C, dont 15 min sous ultrasons. La séparation des phases a été améliorée par un ajout de 10 mL d'Et₂O. Les échantillons ont été agités et centrifugés durant 2 min à 4 700 x g. La phase supérieure organique a été prélevée et séchée sous flux d'azote pendant 2 h à 45 °C (Sample Concentrator, Techne).

La seconde extraction dite « Bligh et Dyer » (Bligh & Dyer, 1959) a été réalisée en mettant en solution les échantillons dans 3 mL d'un mélange MeOH : chloroforme (CHCl₃) (2 : 1 ; v/v). Les tubes ont été soniqués durant 1 h à température ambiante et avec agitation régulière. Les phases ont été séparées par un ajout de 1 mL de CHCl₃ et de 1 mL d'eau Milli-Q avant agitation et centrifugation 2 min à 4 700 x g. La phase inférieure organique a été prélevée et séchée comme précédemment pendant 45 min.

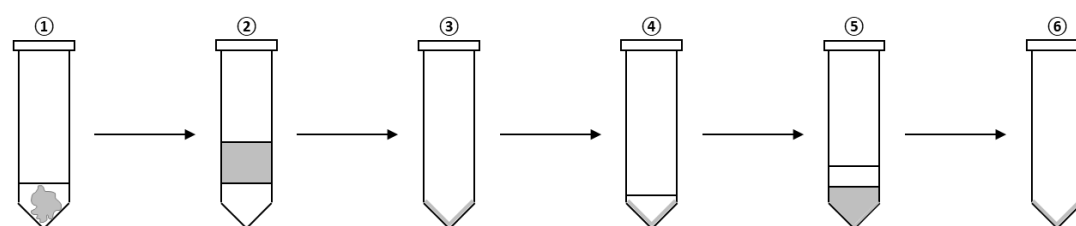
Une troisième étape optionnelle d'hydrolyse alcaline (Clarke & Dawson, 1981) devrait permettre un enrichissement en sphingolipides. Les échantillons ont été mis en suspension dans 6 mL d'un mélange potasse 0,6 M dans MeOH : CHCl₃ (1 : 1 ; v/v), agités et incubés 1 h à température ambiante. Les phases ont été séparées par un ajout de 2 mL d'acide chlorhydrique 1 M et de 750 µL d'eau Milli-Q. La phase inférieure organique a été prélevée après centrifugation 2 min à 4 700 x g et séchée comme précédemment pendant 45 min.

Le culot gras lipidique apparaissant durant le séchage lors des 2^e et 3^e étapes d'extraction a été pesé. Les échantillons ont été conservés sous vide, à l'obscurité et à température ambiante pour prévenir toute dégradation par hydrolyse avant d'être rapidement analysés.

Tableau 4. Descriptif des standards lipidiques commandés chez Avanti Polar Lipids

Lipide	Référence	Formule brute	Structure
Sphingosine* (d17:1)	860640	C ₁₇ H ₃₅ NO ₂	
C ₁₇ Céramide* (d18:1/h17:0)	860517	C ₃₅ H ₆₉ NO ₃	
C ₁₇ Glucosylcéramide* (d18:1/h17:0)	860569	C ₄₁ H ₇₉ NO ₈	
C ₁₈ Glucosylcéramide (d18:1/h18:0)	860547	C ₄₂ H ₈₁ NO ₈	
C _{18:1} Glucosylcéramide (d18:1/h18:1(9Z))	860548	C ₄₂ H ₇₉ NO ₈	
Glucosylcéramide Soja (d18:2/h16:0)	131304	C ₄₀ H ₇₅ NO ₉	

* Ces lipides ont composé le mélange de standards à 1 mM. Le C₁₇ Glucosylcéramide a été utilisé comme étalon interne pour les analyses en spectrométrie de masse.



1^{ère} extraction selon la méthode Mandala

Ajout de mycélium sec et 3 µM de standards lipidiques.

① Ajout du tampon EtOH : eau : Et₂O : pyridine : NH₄OH 4,2 M (15 : 15 : 5 : 1 : 0,018 ; v/v).

Agitation et conservation 1 h à 60 °C (ultrasons 15 min).

② Séparation des phases par ajout d'Et₂O.

③ Séchage de la phase supérieure organique.

2^{ème} extraction selon la méthode Bligh & Dyer

④ Ajout de MeOH : CHCl₃ (2 : 1 ; v/v).

Agitation et ultrasons 1 h à température ambiante.

⑤ Séparation des phases par ajout de CHCl₃ (½ vol.) et d'eau (½ vol.).

⑥ Séchage de la phase inférieure organique.

Hydrolyse alcaline (optionnelle)

Ajout de KOH 0,6 M dans MeOH : CHCl₃ (1 : 1 ; v/v).

Agitation et conservation 1 h à température ambiante.

Séparation des phases par ajout d'acide chlorhydrique 1 M (½ vol.) et d'eau (½ vol.).

Séchage de la phase inférieure organique.

Figure 19. Récapitulatif du protocole d'extraction des sphingolipides de *B. cinerea*

EtOH : éthanol, Et₂O : éther diéthylique, NH₄OH : ammoniac, MeOH : méthanol, CHCl₃ : chloroforme, KOH : potasse

2.3. Séparation et identification des sphingolipides de *B. cinerea*

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode classiquement employée pour l'analyse primaire de sphingolipides (Scandroglio *et al.*, 2008). Le protocole utilisé pour ces travaux a été développé par Maxence Derbez (Alternant, Bayer CropScience). Les échantillons secs et les standards lipidiques (Tableau 4) ont été repris dans une solution dichlorométhane (DCM) : MeOH (2 : 1 ; v/v) pour aboutir à des concentrations de l'ordre du mg/mL. Les dépôts ont été réalisés sous la forme de bandes de 5 mm sur une plaque CCM (gel silice 60 F254 0,25 mm, Merck Millipore) à l'aide d'un échantillonneur automatique (Automatic TLC Sampler 4, Camag). La cuve verticale a été préalablement saturée avec le solvant migratoire pendant 10 min. La migration a été effectuée avec 10 mL d'une phase mobile DCM : MeOH : NH₄OH 2 M (65 : 25 : 4 ; v/v) durant 15 min. Cette composition était recommandée pour l'analyse des sphingolipides neutres (van Echten-Deckert, 2000). La dérivation a été réalisée par immersion de la plaque dans 120 mL d'un réactif sulfate de cuivre 15 % : acide phosphorique : acide sulfurique : MeOH : eau Milli-Q (4 : 1 : 1 : 1 : 1 ; v/v) pendant 8 s à vitesse maximum (Chromatogram Immersion Device 3, Camag). La plaque a été séchée et les bandes ont été révélées après 20 min à 140 °C (TLC Plate Heater 3, Camag).

2.4. Caractérisation structurale des sphingolipides de *B. cinerea*

Les sphingolipides ont été analysés et caractérisés par une approche de spectrométrie de masse hybride haute résolution (UPLC-HRMS) (Barreto-Bergter *et al.*, 2011) en collaboration avec l'équipe du Dr Alexandra Berlioz-Barbier (CCSM, ICBMS Lyon). Brièvement, les échantillons lipidiques secs (extraits et standard GlcCer de soja) ont été repris dans un mélange MeOH : DCM et homogénéisés avant injection de 3 µL. Les lipides ont été séparés sur une colonne de phase inverse C₁₈ (Acquity CSH, 2,1 x 150 mm, 1,6 µm) connectée à un système de chromatographie liquide ultra performance (UPLC) (UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific). La détection a été assurée par spectrométrie de masse de type quadripôle-temps de vol (Impact II, Bruker) après électronébulisation en mode positif et négatif (ESI⁺ et ESI⁻) sur une gamme de masse 50 – 2 200 *m/z*. Les spectres ont été collectés en mode DDA.

3. Production du peptide ETD151 par la levure *S. cerevisiae*

3.1. Matériel biologique

La production hétérologue du peptide ETD151 a été réalisée sur la base des travaux de la société EntoMed S.A. (brevet US20030208035A1, 2003 ; Landon *et al.*, 2004). La souche W303 α (MAT α leu2-3 leu2-112 trp1-1 ura3-1 his3-11 his3-15 ade2-1 can1-100) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été employée pour ce projet. Cette souche était auxotrophe pour trois acides aminés : leucine (L, Leu), histidine (H, His), tryptophane (W, Trp), et deux bases nucléiques : adénine (A) et uracile (U). W303 α a été cultivée à partir de stocks glycérol conservés à -80 °C (CRLD, Bayer CropScience). Pour la suite des travaux et sauf mention contraire, chaque milieu de culture ou d'expression a été complété avec ces cinq éléments. Les milieux YNB et YPD, respectivement « Yeast Nitrogen Base » et « Yeast extract Peptone Dextrose », ont été supplémentés avec de l'agar pour les cultures sur milieu solide (ou étalements). Le milieu YNB et un milieu synthétique (SYNT) ont été utilisés pour les cultures liquides. Ces deux milieux contenaient par défaut du glucose (Glc) pour la croissance des levures. Pour l'expression recombinante, le Glc a été remplacé par un de ses stéréo-isomères, le galactose (Gal). La composition des milieux a été détaillée en Annexe 2.

3.2. Construction du plasmide pDEF151

Le construit a été assemblé selon notre demande par la société Invitrogen (Carlsbad, USA). La carte génétique est présentée en Annexe 3. Le vecteur pDEF151 a été obtenu par clonage du gène synthétique DEF151 dans le plasmide commercial pYES2¹ (Invitrogen). DEF151 fusionne le peptide signal preBGL2 et la séquence codante du peptide ETD151 recodée chez *S. cerevisiae*. preBGL2 permet la sécrétion de la protéine recombinante (Achstetter *et al.*, 1992) dans le milieu d'expression et facilite ainsi les étapes de purification. Le vecteur pYES2 de 5,9 kb est conçu pour l'expression inductible d'une protéine recombinante dans *S. cerevisiae*. Il intègre le promoteur GAL1 régulant le système d'expression protéique en milieu galactose et sa répression en milieu glucose (Partow *et al.*, 2010). pYES2 inclut également le gène *ura3* pour la sélection des transformants prototrophes en uracile (Rose & Botstein, 1983).

¹ <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V82520>

3.3. Préparation du transformant W303α (pDEF151)

La souche W303α a été transformée par Crystel Barbisan (CRLD, Bayer CropScience) en utilisant un protocole dérivé de Dohmen et collaborateurs (1991). Brièvement, 4 µL (1 µg) du plasmide pDEF151 et 5 µL (50 µg) d'ADN vecteur monobrin (sperme de saumon) ont été déposés sur une suspension congelée de 200 µL de levures compétentes (W303α) préparées en amont. L'ensemble a été rapidement décongelé sous agitation à 37 °C. L'échantillon a été mélangé délicatement avec 1,4 mL d'un mélange PEG 1000 40 %/Bicine-NaOH 0,2 M et incubé sous agitation lente 1 h à 30 °C. Les cellules ont été culotées par centrifugation 1 min à 3 000 x g et lavées dans 1 mL d'une solution NaCl 0,15 M/Bicine-NaOH 10 mM. Les colonies transformées ont été sélectionnées par étalement sur un milieu YNB dépourvu en uracile (YNB-U) et incubation 48 h à 30 °C. Des stocks glycérol 20 %, conservés à -80 °C, ont été préparés à partir d'une colonie cultivée 24 h en milieu YNB-U sous agitation et à 30 °C.

3.4. Culture des souches W303α et W303α (pDEF151)

Un échantillon des souches W303α et W303α (pDEF151), issus des stocks glycérol, a été étalé respectivement sur milieu YPD et sur milieu YNB-U. Les boîtes de Petri ont été incubées 48 à 72 h à 30 °C pour obtenir des colonies fraîches. Des précultures liquides en tubes de 50 mL (Centrifuge Tubes, TPP) ont été préparées en inoculant 15 mL de milieu avec une de ces colonies fraîches. Les tubes ont été incubés pendant une nuit sous agitation et à 30 °C. La croissance des levures a été mesurée par lecture de la densité optique (DO) à 600 nm (Uvikon XS, Secoman). Les cultures ont été lancées à une DO initiale de 0,1 en inoculant le volume souhaité de milieu ($V_{culture}$) avec un volume de précultures ($V_{précultures}$) défini par la formule ci-dessous. Le choix des erlenmeyers a été adapté au volume des cultures afin de respecter un ratio milieu/air équivalent à $\frac{1}{4}$ ou $\frac{1}{5}$.

$$V_{précultures} = \frac{V_{culture} \times DO_{initiale}}{DO_{préculture}}$$

Le volume de précultures a généralement été concentré pour l'ensemencement par centrifugation 5 min à 420 x g. Le culot de levures a été remis en suspension dans du milieu SYNT frais additionné de Glc (milieu Glc) avant incubation sous agitation et à 30 °C. La phase de croissance a été suivie par mesure de la DO.

3.5. Production du peptide ETD151 recombinant (ETD151r)

La production par la souche W303 α (pDEF151) a été contrôlée lors de deux phases de production en erlenmeyers, à l'échelle 100 mL et à l'échelle 1 L. La phase de croissance a été opérée en milieu Glc, sous agitation et à 30°C. Les milieux de culture ont été ensuite regroupés et centrifugés 5 min à 420 x g pour des volumes faibles (100 à 400 mL) ou à 830 x g pour des volumes élevés (1 L). Le culot de levures a été mis en suspension dans le milieu d'expression constitué de SYNT additionné de Gal (milieu Gal). La phase d'expression a été conduite par incubation sous agitation et à 30 °C. Les milieux ont été ensuite regroupés et centrifugés 10 min respectivement à 1 700 x g ou à 3 300 x g. Les culots de levures ont été conservés à -80 °C. Le surnageant contenant le peptide sécrété a été filtré sur une membrane polyéthersulfone (PES) de 0,22 μ m (Steriflip-GP, Merck Millipore) pour un volume de 100 mL ou sur une membrane SFCA de 0,2 μ m au-delà. L'échantillon a été conservé à 4 °C jusqu'à utilisation.

3.6. Purification du peptide ETD151r

Le surnageant a été purifié selon le protocole établi par Landon et collaborateurs (2004). Un tampon citrate 25 mM à pH 3 a été préparé par addition de 200 mL d'une solution d'acide citrique 50 mM, 50 mL d'une solution de citrate de sodium 50 mM et 250 mL d'eau Milli-Q. Le pH du surnageant a été préalablement ajusté à 3 par un ajout d'acide acétique. Le peptide ETD151r a été purifié sur une membrane échangeuse de cations (Sartobind MA 15 S, Sartorius). En respectant les recommandations du fournisseur, la membrane a été équilibrée avec 10 mL de tampon citrate. Le surnageant a été chargé lentement (10 mL/min) avant de laver la phase avec 10 à 20 mL de tampon citrate. Le peptide d'intérêt a été élué par deux ajouts successifs de 10 mL d'une solution NaCl 1 M. La membrane a été finalement régénérée avec 10 mL de tampon citrate et conservée dans une solution EtOH 20 %/tampon citrate. L'éluat peptidique a été dessalé sur trois cartouches SPE (voir Matériels et Méthodes, p. 65). Les différentes fractions provenant de la SPE (chargement, éluat, lavage) ont été aliquotées dans des flacons en verre et concentrées par évaporation sous vide (Low BP Mixture, EZ-2 Evaporator, Genevac). Les échantillons secs ont été conservés à 4 °C jusqu'à analyse.

3.7. Extraction des protéines non sécrétées par la souche W303 α (pDEF151)

La sécrétion du peptide ETD151r a été examinée après extraction des protéines du culot de levures post-expression. Ce dernier a été décongelé et repris dans 2 mL de tampon HEPES 100 mM pH 7,5/NaCl 50 mM/Triton X-100 0,05 %, complété au dernier moment par un inhibiteur de protéases (cOmplete EDTA-free, Roche). Des perles congelées ont été préparées par immersion dans l'azote liquide et broyées par des billes de verre de 0,1 mm. La poudre générée a été reprise dans 20 mL de tampon froid et laissée sous agitation rotative (Stuart) pendant 30 min à 4 °C. L'échantillon a été centrifugé 10 min à 3 000 x g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines solubles a été centrifugé 20 min à 20 800 x g. Les échantillons ont été purifiés sur cartouches SPE (voir Matériels et Méthodes, p. 65) et élués dans 15 à 60 % d'ACN. Les éluats ont été évaporés sous vide et conservés à 4 °C.

3.8. Identification du peptide ETD151r dans le surnageant d'expression

L'expression du peptide ETD151r par la souche W303 α (pDEF151) a été validée analytiquement par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) (Schägger & von Jagow, 1987) et détection en Western Blot (Towbin *et al.*, 1979). Plusieurs solutions ont été préparées en amont des analyses : un tampon de lyse Laemmli par addition de 50 μ L de 2-mercaptoéthanol (Bio-Rad) et 950 μ L de tampon Laemmli 2x (Bio-Rad), une solution Tris-Glycine-SDS (TGS) 1x par dilution de 100 mL de TGS 10x (Bio-Rad) dans 900 mL d'eau Milli-Q, une solution Tris Buffered Saline (TBS) 1x par dilution de TBS 10x (Bio-Rad) et une solution Tween-TBS (TTBS) 1x par ajout de 500 μ L de Tween 20 dans une solution de TBS 1x.

3.8.1. Séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les fractions (voir Matériels et Méthodes, p. 76) ont été resuspendues dans 50 μ L d'eau ultra pure traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC-Treated Water, Invitrogen). Les échantillons ont été agités et centrifugés 1 min à 5 000 x g. Un aliquot de 22,5 μ L a été prélevé et complété avec 22,5 μ L de tampon Laemmli. Le mélange a été incubé 5 min à 95 °C puis transféré dans la glace. Chaque échantillon de 45 μ L a été déposé dans un puits de la cuve d'électrophorèse avec 10 μ L des protéines standards de migration (Precision Plus Protein All Blue, Bio-Rad) et de révélation (Precision Plus Protein Unstained Protein, Bio-Rad).

Les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) (4–20 % Criterion TGX Stain-Free, Bio-Rad).

La migration électrophorétique a été effectuée en présence de TGS 1x pendant 20 à 25 min à 250 V. Les protéines ont été révélées par fluorescence des tryptophanes exposés à une courte photo-activation UV (ChemiDoc Touch Imaging System, Bio-Rad).

3.8.2. Détection du peptide en Western Blot

Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Protran 0,1 µm NC, GE Healthcare) en utilisant un kit adapté (Trans-Blot Turbo Midi Nitrocellulose, Bio-Rad). Le transfert a été réalisé à l'aide du programme Turbo, midi gel : 2,5 A, 25 V, 3 min (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad) et contrôlé avec le standard de révélation. La membrane a été bloquée par 20 à 30 mL d'une solution de blocage (Western Blocker Solution, Sigma-Aldrich) pendant 45 à 60 min sous faible agitation et à température ambiante.

L'hybridation a été réalisée en deux étapes. Les anticorps primaires utilisés étaient des anticorps polyclonaux, obtenus chez le lapin néo-zélandais après immunisation avec un mélange de deux épitopes du peptide ETD151 (ProteoGenix, Schiltigheim, France). Un aliquot de 100 µL a été dilué dans 25 mL de solution de blocage. La membrane a été incubée en présence de l'anticorps pendant 60 min sous faible agitation et à température ambiante. Elle a été ensuite lavée trois fois avec 50 mL de TTBS 1x durant 10 min et sous faible agitation. L'incubation et les trois lavages ont été répétés après ajout de l'anticorps secondaire : 2,5 µL d'Immun-Star Goat Anti-Rabbit (GAR)-HRP Conjugate (Bio-Rad) et 1 µL de Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate dans 25 mL de TTBS 1x. La membrane a été ensuite lavée avec 50 mL de TBS 1x pendant 5 min et sous faible agitation.

Les protéines ont été révélées par incubation de la membrane avec un excédent de substrat (Clarity ou Clarity Max Western ECL, Bio-Rad) durant 5 min. Cette dernière a été ensuite placée entre deux films plastiques avant imagerie (ChemiDoc Touch Imaging System, Bio-Rad).

3.9. Analyse des échantillons par MALDI-MS

L'expression et la sécrétion du peptide ETD151r ont été également contrôlées par analyse MALDI-MS. Les échantillons secs ont été repris dans 100 µL d'une solution ACN 20 %/TFA 0,1 % final. Des gammes de dilutions 10x et 100x ont été préparées dans de l'eau Milli-Q acidifiée avec du TFA 0,1 %. Les analyses ont été réalisées selon la méthode décrite précédemment (voir Matériels et Méthodes, p. 67) en déposant 1 µL de l'échantillon et 1 µL de la matrice 4-HCCA.

3.10. Production du peptide ETD151r en fermenteur

Une étude pilote a été conduite en fermenteur de 10 L (Biostat Cplus, Sartorius) afin d'accroître le rendement d'expression obtenu en erlenmeyers et de disposer de la quantité de peptide requise pour l'analyse RMN. La croissance a été réalisée dans un milieu SYNT appauvri en Glc, 30 % de la concentration habituelle. Le milieu Glc 30 % (9 L), préalablement stérilisé dans le fermenteur, a étéensemencé à une DO_{initiale} de 0,1 à l'aide d'une préculture de la souche W303 α (pDEF151). Le milieu pouvant s'acidifier pendant la fermentation, le pH a été autorégulé à 5,5 par ajout d'acide phosphorique 10 % ou de NH_4OH 20 %. L'apport en oxygène (pression partielle pO_2 à 70 %) et la vitesse d'agitation des hélices ont été contrôlés par ordinateur selon le comportement de la souche d'expression et les valeurs fournies par les sondes de mesure. Le milieu Glc 30 % a été incubé 9 h sous agitation (290 rpm) et à 30 °C. La phase d'expression du peptide ETD151r a été initiée par un ajout de 1 L de milieu Gal dans le réacteur. L'évolution de la croissance a été suivie régulièrement par mesure de la DO_{600} à partir de prélèvements. Le fermenteur a été stoppé après 15 h d'expression. Le milieu de culture a été centrifugé 10 min à 3 300 x g et le surnageant a été conservé à 4 °C jusqu'à purification et analyse. Le culot de levures a été conservé à -80 °C.

3.11. Production du peptide ETD151r marqué par un isotope stable

L'expression recombinante d'ETD151 marqué isotopiquement et uniformément à l'azote 15 (^{15}N -ETD151r) a été confiée à la société Promise (Grenoble, France). Une souche de *S. cerevisiae* (Mata α ura3) a été transformée pour intégrer un vecteur d'expression doté du promoteur fort TEF et des séquences codantes du peptide signal *BGL2* et du gène *ETD151*.

Brièvement, les transformants ont été sélectionnés sur un milieu Synthétique Complet² dépourvu en uracile (SC-U). Huit colonies ont été pré-cultivées pendant 24 h dans 10 mL de milieu SC-U incorporant du sulfate d'ammonium marqué $(^{15}NH_4)_2SO_4$ comme unique source d'azote. Des cultures de 100 mL ont été ensuite lancées dans le même milieu et incubées 24 à 72 h sous agitation et à 30 °C. Des aliquots de 10 mL ont été prélevés et centrifugés. Le surnageant pré-acidifié (pH 3) a été purifié sur une résine échangeuse de cations (Cônes PureSpeed CEX, Mettler Toledo). L'expression du peptide ^{15}N -ETD151r a été validée par analyse SDS-PAGE des fractions éluées. Le rendement d'expression pré et post-purification a été évalué par analyse densitométrique du gel révélé au Bleu de Coomassie (G-250, Bio-Rad).

² <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8190>

La détermination des rendements a été effectuée par comparaison avec le peptide ETD151 pur et non marqué (fourni par le Dr Philippe Bulet). Après réduction, alkylation et trypsinolyse de la fraction purifiée ^{15}N -ETD151r, la séquence protéique et l'incorporation de l'isotope ^{15}N ont été vérifiées par analyse nanoLC-MS/MS (UltiMate 3000, Q-Exactive, Thermo Fisher Scientific). La production à grande échelle a débuté suite à la validation de l'étape de mise au point.

À partir de précultures 24 h de 250 mL, 4 L de milieu SC-U ($^{15}\text{NH}_4$) $_2\text{SO}_4$ ont étéensemencés et incubés 72 h sous agitation et à 30 °C. Le milieu a été centrifugé et le surnageant pré-acidifié a été filtré sur une membrane de 0,2 μm . Le peptide ^{15}N -ETD151r a été concentré et purifié sur une colonne échangeuse de cations (HiTrap SP HP 5 mL, GE Healthcare) connecté à un système FPLC (Äkta, GE Healthcare). Les fractions ont été éluées sur un gradient linéaire de NaCl (0,1 à 1 M), analysées par SDS-PAGE et regroupées si nécessaire. À l'image de la première étape, la fraction ^{15}N -ETD151r a été injectée en nanoLC-MS/MS. Le repliement correct du peptide ainsi que sa quantification définitive ont été validés par co-élution avec la référence ETD151 en phase inverse RP-HPLC (ExionLC, Sciex) couplée à un détecteur UV et à un spectromètre de masse (QTRAP 6500, Sciex). Le produit a été livré en solution dans du NaCl 0,5 M et conservé à -80 °C jusqu'à utilisation.

3.12. Dessalage du peptide ^{15}N -ETD151r

Le produit a été acidifié à pH 3 par ajout de TFA 5 % et dessalé sur une cartouche SPE en phase inverse (Sep-Pak C $_{18}$ 3cc Vac 500 mg, 55-105 μm , Waters) selon la méthode décrite précédemment (voir Matériels et Méthodes, p. 65). Les différentes fractions générées par le procédé (exclusion, lavage, éluat) ont été analysées par MALDI-MS (voir Matériels et Méthodes, p. 78). Une partie du peptide ^{15}N -ETD151r n'ayant pas été retenue sur la cartouche, la fraction d'exclusion a été également dessalée sur SPE. L'ensemble des éluats dans ACN 60 %/TFA 0,1 % final a été regroupé et réparti dans cinq tubes pour la lyophilisation (CentriVap Vacuum Concentrator, Labconco). Les échantillons secs de ^{15}N -ETD151r ont été transmis au CBM d'Orléans pour débiter les études de RMN.

4. Test d'activité sur la voie de réponse aux stress osmotiques

Les composés induisant la voie de signalisation « High-Osmolarity Glycerol » (HOG) en l'absence de stress osmotique sont identifiés en mesurant la sur-accumulation de glycérol dans la cellule. À l'image des travaux de Pillonel & Meyer (1997), l'activité d'un composé a été évaluée par dosage du glycérol intracellulaire.

Le test s'est appuyé sur la cascade de réactions enzymatiques (Figure 20) qui conduit à oxyder la forme réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide NADH en NAD⁺. La quantité de NAD⁺ est stœchiométrique à la quantité de glycérol et mesurable par absorbance à 340 nm.

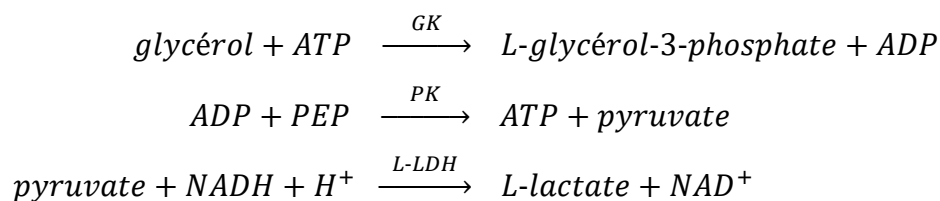


Figure 20. Cascade de réactions enzymatiques permettant le dosage du glycérol intracellulaire

ATP : Adénosine triphosphate, GK : Glycérol kinase, ADP : adénosine diphosphate, PEP : phosphoénolpyruvate, PK : Pyruvate kinase, NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide, L-LDH : L-lactate déshydrogénase, NAD⁺ : forme oxydée de NADH

À partir d'une solution de spores fraîches de la souche B047 cultivée 10 à 15 jours sur milieu PDA, 250 mL de milieu liquide GYPm (composition en Annexe 2) ont étéensemencés à 10⁵ sp/mL et incubés 18 h sous agitation à 22 °C. Plusieurs erlenmeyers contenant 15 mL de la préculture 18 h ont été traités avec 150 µL du composé à tester (concentré 100x) à différentes doses : Cl₅₀, Cl₈₀ et 10xCl₅₀. Pour ce test, le peptide ETD151, dilué dans de l'eau Milli-Q stérile, a été comparé à l'iprodione (LGC Standards), dilué dans le DMSO et utilisé comme contrôle positif (Cui *et al.*, 2002).

À la suite d'une nouvelle période d'incubation de 6 à 24 h, les cultures ont été filtrées sous vide sur un filtre nylon de 100 µm (SEFAR Nitex). Le mycélium a été rincé à l'aide d'eau Milli-Q, transféré dans un tube Eppendorf, et congelé dans l'azote liquide avant lyophilisation. L'échantillon a été remis en suspension dans de l'eau Milli-Q (1 mL pour 10 mg de mycélium sec) et incubé 15 min à 100 °C. Le surnageant a été prélevé après 10 min de centrifugation à 3 000 x g.

Le glycérol intracellulaire a été dosé à l'aide du kit spectrophotométrique « Yellow line – Glycerol » (Roche) en respectant les recommandations du fournisseur. Brièvement, le mélange 1 (tampon glycyglycine pH 7,4/NADH/ATP/PEP/sulfate de magnésium) a été reconstitué dans 11 mL d'eau Milli-Q avant ajout de 110 µL du mélange 2 (PK/L-LDH). Le test

a été effectué en microplaque 96 puits (Greiner Bio-One) où chaque puits contient soit 200 μ L d'une gamme étalon de glycérol, soit 200 μ L de surnageant dilué dans l'eau (40x, 20x, 10x et 4x). Une première mesure d'absorbance à 340 nm a été effectuée après ajout de 100 μ L du mélange 1-2 et agitation (Infinite M1000, Tecan). Le mélange 3 (GK, 10 μ L), dilué 10x dans l'eau, a été ajouté avant incubation 5 min à l'obscurité et sous agitation. Une nouvelle mesure d'absorbance a été effectuée avant calcul.

5. Approches par microscopie à fluorescence et microscopie confocale

5.1. Test d'activité antifongique sur les souches B047 et B05.10 de *B. cinerea*

La concentration inhibitrice médiane CI_{50} a été déterminée selon la méthode décrite précédemment (voir Matériels et Méthodes, p. 65). Brièvement, les puits d'une microplaque 96 puits (TPP) ont étéensemencés avec 200 μ L d'une suspension de spores fraîches à 10^4 sp/mL final en milieu PDB $\frac{1}{4}$ (composition en Annexe 2). L'effet du peptide ETD151 sur la germination des spores et l'élongation mycélienne a été évalué en présence de 0,19 à 3,12 μ M final de peptide (2 μ L de solutions stocks concentrées 100x). L'activité du peptide ETD151 a été mesurée après 3 et 7 jours d'incubation par lecture de l'absorbance à 620 nm (Infinite M1000, Tecan) et exprimée sous la forme d'un pourcentage d'inhibition de la croissance.

5.2. Phénotypage de *B. cinerea* par microscopie à fluorescence

Les observations phénotypiques ont été effectuées sur un format de microplaques 96 puits (TPP) à l'aide d'un microscope inversé automatisé (ImageXpress Micro XL, Molecular Devices). Les modifications morphologiques sur des spores (200 μ L à 10^4 sp/mL) ou du jeune mycélium (incubation 24 h) du champignon *B. cinerea* en milieu PDB $\frac{1}{4}$ ont été répertoriées à différentes concentrations d'ETD151 et sur plusieurs intervalles de temps, constituant un « time-lapse ». La perméabilisation membranaire a été évaluée par ajout de 1,2 μ L du marqueur SYTOX Green en solution à 5 mM dans le DMSO (Invitrogen) et comparaison avec une molécule référence, le suloctidil (Spitzer *et al.*, 2011). Les acquisitions ont été réalisées en lumière transmise (TransLight) et en fluorescence (filtre GFP, $\lambda_{Excitation} = 472$ nm, $\lambda_{Émission} = 520$ nm) (Tableau 5). La mise au point pour chacun des puits et pour chaque intervalle de temps a été assurée automatiquement par un laser. Au grossissement optique 60x, les microplaques (TPP) ont été remplacées par un modèle de qualité supérieure (SensoPlastic, Greiner Bio-One). Les images ont été capturées et traitées par le logiciel MetaXpress (v5.1.0.46).

Tableau 5. Paramètres d'observation en microscopie inversée

Objectif	Intensité Translight	Temps d'exposition TransLight	Temps d'exposition GFP
10x Plan Fluor ELWD	TransLight50	30 ms	100 ms
40x Plan Fluor ELWD	TransLight50	30 ms	100 ms
60x Plan Fluor ELWD	TransLight100	100 ms	100 ms

5.3. Marquage du peptide ETD151 par le fluorophore BODIPY FL

L'optimisation de la conjugaison entre le peptide ETD151 et le fluorophore BODIPY a été confiée à la société Genepep (Saint-Jean-de-Védas, France). Deux équivalents du fluorophore (BDP FL NHS ester³, Lumiprobe) ont été dissous dans 100 µL de *N,N*-diméthylformamide (DMF) et ajoutés dans un tampon HEPES pH 7,5 contenant un équivalent du peptide ETD151. Le mélange a été agité pendant 5 h à température ambiante. Il a été ensuite purifié par chromatographie en phase inverse C₁₂ (Jupiter Proteo, 250 x 10 mm, 4 µm) sur un système de RP-HPLC (Agilent) à l'aide d'un gradient de 10 à 60 % d'ACN/TFA 0,1 %. Les fractions contenant le peptide conjugué BODIPY ont été analysées sur un système UPLC (Acquity H-Class, Waters), couplé à un détecteur UV et à un spectromètre de masse (SQ Detector 2, Waters), pour une quantification et une détermination de leur pureté. Le nombre de conjugaisons BODIPY a été déterminé par analyse du contenu élémentaire net (Flash 2000 CHNS/O Analyzer, Thermo Fisher Scientific).

5.4. Identification du site de conjugaison sur le peptide ETD151-BODIPY

Les fractions transmises sous la forme de poudre par la société Genepep ont été mises en solution dans un mélange Eau/DMSO 10 % afin de tester leur activité antifongique sur des spores du champignon *B. cinerea* (souche B047) (voir Matériels et Méthodes, p. 83). La fraction ETD151-BODIPY démontrant une activité similaire à la référence ETD151 pure a été retenue pour l'approche de microscopie confocale et la vérification du site de marquage. Un aliquot de 8 µg, prélevé en amont, a été mis en suspension dans 20 µL de tampon ABC 50 mM et réduit par un ajout de 2 µL de dithiothréitol 280 mM, incubation 30 min à 56 °C et à l'obscurité. L'échantillon a été alkylé par addition de 4 µL d'iodoacétamide 480 mM, incubation 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Le peptide a été ensuite digéré en ajoutant 2,5 µL de l'enzyme Glu-C (V1651, Promega) à 0,2 µg/µL avant incubation à 37 °C sur la nuit. L'échantillon final a été acidifié par 4 µL d'un mélange ACN 20 %/TFA 10 % avant analyse MALDI-MS.

³ <https://www.lumiprobe.com/p/bodipy-fl-nhs-ester>

5.5. Localisation du peptide ETD151-BODIPY par microscopie confocale

Ces études ont été effectuées dans les mêmes conditions expérimentales qu'exposées précédemment (voir Matériels et Méthodes, p. 83). Des spores et du jeune mycélium du champignon *B. cinerea* (souche B047 en milieu PDB ¼) ont été traités avec 0,19 à 0,78 µM final d'ETD151-BODIPY en microplaque 96 puits (SensyPlate Glass Bottom, Greiner Bio-One). La paroi cellulaire fongique a été marquée par l'ajout de 9 µg/mL du fluorophore Calcofluor White M2R. La voie de l'endocytose intégrant la membrane plasmique et le trafic vésiculaire a été colorée par l'ajout de 5 µg/mL de la sonde FM 4-64, préparée selon les recommandations du fournisseur.

L'imagerie a été réalisée immédiatement après addition des différents marqueurs à l'aide d'un microscope inversé (Axio Observer.Z1, Zeiss) associé à une unité confocale à balayage laser (LSM 800, Zeiss). Cette dernière a été équipée de tubes photomultiplicateurs, d'un détecteur lumière transmise (ESID), de trois détecteurs phospho-arséniure de gallium (GaAsP) et de deux objectifs à immersion dans l'huile, Plan-Apochromat 63x/1,40 et 100x/1,40. Les images ont été capturées et traitées par le logiciel Zen (v2.3).

Tableau 6. Paramètres d'observation en microscopie confocale

Marqueur	Fournisseur	$\lambda_{\text{Excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{Émission}}$ (nm)	Référence
Calcofluor	F3543, Sigma-Aldrich	405	410 – 470	Gull & Trinci, 1974
BODIPY FL	BDP, Lumiprobe	488	495 – 550	-
FM 4-64	T13320, Invitrogen	488	656 – 700	Fischer-Parton <i>et al.</i> , 2000

TRAVAUX DE RECHERCHE

CHAPITRE I.
Études protéomiques

La volonté à travers ces travaux de thèse a été d'explorer le mécanisme d'action du peptide ETD151 sur le champignon *B. cinerea* par des approches innovantes et pluridisciplinaires. Nous avons ainsi opté pour des études protéomiques différentielles afin d'évaluer l'impact moléculaire du peptide ETD151 sur le champignon cible. Dans le cadre de la thèse CIFRE, le partenaire industriel nous a fait bénéficier d'une souche obtenue en champ (B047) et pour laquelle les conditions de culture ont été optimisées en microplaque 96 puits. Les études ont été menées sur des extraits de jeune mycélium, en adéquation avec les travaux publiés sur le champignon *B. cinerea* et les autres approches (microscopie, sphingolipidomique) utilisées durant la thèse. Des données préliminaires obtenues en amont de la thèse avaient mis en évidence des empreintes peptidiques et protéiques différentielles de l'effet du peptide ETD151 sur *B. cinerea*. Ces résultats ont été confortés dans un premier temps par la réalisation d'empreintes moléculaires par MALDI-MS en absence ou en présence de différentes concentrations du peptide antifongique. Dans un second temps, un design expérimental a été mis en place pour analyser par LC-ESI-MS/MS des extraits digérés (approche bottom-up). En s'appuyant sur la reproductibilité des données et sur des analyses statistiques, l'objectif a été d'identifier des protéines et des voies métaboliques du champignon *B. cinerea* impactées significativement par le peptide ETD151.

Impact of an antifungal insect defensin on the proteome of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*

*Thomas Aumer*¹, *Sébastien N. Voisin*², *Thomas Knobloch*³, *Céline Landon*⁴, *Philippe Bulet*^{1,2*}

¹ CR Université Grenoble Alpes, Institute for Advanced Biosciences, Inserm U1209, CNRS UMR 5309, Grenoble, France

² Plateforme BioPark d'Archamps, Archamps Technopole, Saint Julien en Genevois, France

³ Bayer SAS, Bayer CropScience, Centre de Recherche de la Dargoire, Lyon, France

⁴ Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, Orléans, France

* Corresponding Author

Dr Philippe Bulet

Plateforme BioPark d'Archamps, Bât. Le Forum 1, 260 Avenue Marie Curie, Archamps Technopole, Saint Julien en Genevois Cedex, France

E-mail address: philippe.bulet@univ-grenoble-alpes.fr, philippe.bulet@biopark-archamps.org

Abstract

ETD151, an analogue of the antifungal insect defensin heliomicin, is an antifungal peptide active against yeasts and filamentous fungi. In order to decipher the mechanisms underlying its molecular action on the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*, a necrotrophic pathogen responsible for gray mold disease, we investigated the changes in three-day old mycelia upon treatment with different concentrations of ETD151. Optical and fluorescent microscopies were used prior to establishing the peptide/protein profiles through two mass spectrometry approaches: MALDI profiling, to generate molecular mass fingerprints as peptide signatures, and a gel-free bottom-up proteomics approach. Our results show that a concentration of ETD151 above the half-maximal inhibitory concentration can alter the integrity of the mycelial structure of *B. cinerea*. Furthermore, reproducible modifications of the peptide/protein composition were demonstrated in the presence of ETD151 within a 1,500 – 16,000 mass (m/z) range. After the robustness of LC-ESI-MS/MS analysis on *B. cinerea* mycelial extracts was confirmed, our analyses highlighted 340 significantly modulated proteins upon treatment with ETD151 within a 4.8 – 466 kDa mass range. Finally, data mapping on KEGG pathways revealed the molecular impact of ETD151 on at least six pathways, namely spliceosome, ribosome, protein processing in endoplasmic reticulum, endocytosis, MAPK signaling pathway and oxidative phosphorylation.

Keywords: Insect defensin, antifungal defensin, *Botrytis cinerea*, proteomics, fungal infection, heliomicin, mechanism of action

Introduction

Phytopathogenic fungi are a major concern for crops in agriculture. In the last decade, phytopathology experts have alerted the scientific community to several species threatening food security and biodiversity¹. Every year, fungal pathogens destroy more than 125 million tons of the world's top five major crops²: rice (rice blast caused by *Magnaporthe oryzae*), wheat (rust caused by *Puccinia graminis*), maize (smut caused by *Ustilago maydis*), potatoes (late blight caused by *Phytophthora infestans*) and soybean (rust caused by *Phakospora pachyrhizi*). These production losses could feed an additional 600 million people per year. Among the phytopathogenic fungi, *Botrytis cinerea* (teleomorph *Botryotinia fuckeliana*) is a necrotrophic pathogen responsible for gray mold disease causing significant crop losses in more than 200 plant species worldwide^{3,4}. Ranked scientifically and economically as the second most important fungal pathogen by the international phytopathological community⁵, *B. cinerea* generates significant costs over a broad host range. Damage occurs in different stages of fruit and vegetable production in open fields or in greenhouses and requires extensive disease control, mainly by fungicide application. Concerns about this fungus have also increased due to the recent discovery of *B. cinerea* fungicide-resistant strains in field populations⁶. The introduction of site-specific fungicides almost 50 years ago revolutionized crop protection and has remained until now the main approach for reducing fungal disease progression. However, plant pathogenic fungi can adapt, leading to a tremendous loss of plant protection effectiveness. Fungicide resistant pathogens have emerged over time and spread globally⁷. Most important classes of antifungals (e. g. benzimidazoles, strobilurins, hydroxylanilides) are concerned by the development of resistance compromising the efficacy of crop protection. As a new major challenge, it is necessary to propose novel fungicides with innovative mechanisms of action or alternative strategies with non-chemical products⁸.

Scientists are investigating the field of antimicrobial peptides (AMPs), looking for new molecules with novel targets, reduced toxicity and broad-spectrum activity for a low-rate use. Also known as host defense peptides (HDPs), AMPs are key components of the innate immune system of all organisms, protecting them against attacks by invading pathogens and stressors⁹. Even if a wide range of AMPs have been identified, they can be globally classified according to their amino acid composition, their structure and the organization of their disulfide bonds. One of these classes, the CS α β -defensins (Cysteine-stabilized α -helix β -sheet), groups small, cationic, cysteine-rich peptides with specific 3D organization and conserved disulfide bridge

arrays^{10–12}. Intriguingly, the CS $\alpha\beta$ -defensins have been found in plants and insects. Plant defensins are well-known and extensively studied for their antifungal activity¹³. On the contrary, only a few insect defensins have been reported to be exclusively antifungal, most of them exhibiting antimicrobial activities (antibacterial and antifungal), with particular efficacy against Gram-positive bacteria¹⁴. The first antifungal insect defensin to be described was drosomycin^{15,16} from the fruit fly *Drosophila melanogaster* (Diptera). It was followed by heliomicin^{17,18} from the tobacco budworm *Heliothis virescens* (Lepidoptera), termicin^{19,20} from *Pseudacanthotermes spiniger* (Isoptera), gallerimycin²¹ from the great wax moth larvae *Galleria mellonella* (Lepidoptera) and ARD1²² from the larvae of *Archaeoprepona demophon* (Lepidoptera).

The promising *in vitro* antifungal activity of insect defensins against plant or human pathogens, as well as their non-cytotoxicity, highlights their potential as candidates for crop protection strategies²³ and/or therapeutic applications²⁴. In the 2000s, the French biotechnology company EntoMed SA was the first to develop natural insect AMPs for the treatment of systemic fungal infections affecting immunocompromised patients²⁵. Heliomicin was the working model of a cutting-edge optimization program based on phylogenic exploration and fine-tuned mutagenesis. The results of their work, a 44 amino acid peptide, called ETD151, revealed enhanced antifungal activity against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* as well as additional activity against *Cryptococcus neoformans*, as compared to heliomicin²². ETD151 was the principal product developed by EntoMed SA for treating antifungal infections²⁶.

However, limited data has been gathered on the antifungal mechanism of action of insect defensins, which include the inhibition of spore germination, the alteration of germ tube elongation and the release of cytoplasmic content^{23,27}. Comparisons based on structural analysis and activity tests on fungal mutants, provided evidence of mechanical commonalities between heliomicin, drosomycin and some antifungal plant defensins such as the radish defensin RsAFP2^{28–30}. In contrast to insect defensins, the mechanisms of action of plant defensins have been widely investigated. In most cases, the first step is the interaction with non-protein fungal membrane partners such as sphingolipids or phospholipids³¹. Thereafter, plant defensins can either be internalized or remain outside the fungal cells. Cell death can occur via multiple mechanisms, induction of fungal membrane permeabilization, reactive oxygen species (ROS), apoptosis, or mitochondrial functionality loss³². Effects differ depending on the target organism; the mechanisms of action of the *Medicago* spp. defensin MtDef4

against the ascomycete fungi *Neurospora crassa* and *Fusarium graminearum*³³ are not the same. Upon exposure to antifungal plant defensins, fungal cells will induce mechanisms to defend themselves against these adverse effects. A family of conserved kinases, MAPK, regulate tolerance to plant defensins. In yeast, the MAPK pathways are involved in filamentous growth, cell wall integrity (CWI) and the high osmolarity/glycerol (HOG) response³⁴. All of these elements provide a background for studying the mode of action of ETD151, an optimized peptide analogue of the two lepidopteran insect antifungal peptides heliomycin and ARD1.

To decipher the mechanism of action of ETD151 on the fungal phytopathogen *B. cinerea*, a proteomics approach based on matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry coupled to electrospray ionization (LC-ESI-MS/MS) was used. The elucidation of the *B. cinerea* genome was a significant breakthrough for the proteomics research community and has provided for the accurate identification of proteins in this fungus, mainly from mycelial samples^{35–38}. In the past ten years, several methodological developments and technological advances in *Botrytis* proteomics have offered effective new tools for achieving a better understanding of *B. cinerea* biology and how its proteins are involved in pathogenic biological processes^{39,40}. Most of these works focused on the secretome or virulence factors produced by the fungus, like cell wall degrading enzymes, considered as key elements in the different steps of the infection cycle of phytopathogenic fungi^{41,42}.

Due to the dynamic nature of the proteome, the addition of an antifungal compound should affect processes occurring at the surface and / or within the fungal cell⁴³. In order to gain insight into the mechanism of action of ETD151 on the fungus *B. cinerea*, we compared the protein profiles of extracts of fresh mycelia treated with the defensin *versus* untreated cultures. To pursue this objective, we developed a methodological proteomic workflow from the preparation of the crude biological matrix to the data analysis and processing. Through complementary mass spectrometry approaches, namely MALDI-MS profiling and differential LC-ESI-MS/MS, we were able to bring bricks to the elucidation of the mechanism of action of our antifungal candidate on *B. cinerea*. Our results suggest that MALDI-MS profiling could be a rapid and simple method to follow if an antifungal molecule as an effect on its fungal target while LC-ESI-MS/MS data provide insight into the pathways altered in response to the ETD151 treatment.

Materials and Methods

Chemical reagents

A liquid minimum medium based on Tanaka's medium B^{44,45}, a Potato Dextrose Broth medium diluted 1:4 in water (25% PDB) and mitochondrial activity test solutions were prepared using reagents from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Potato Dextrose Agar (PDA) was purchased from Oxoid (Basingstoke, UK). The reagents α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (4-HCCA), ammonium bicarbonate (ABC), dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAA), HPLC-grade dimethyl sulfoxide (DMSO) and LC-MS-grade formic acid (FA) were from Sigma-Aldrich. SYTOX Green Nucleic Acid Stain (5 mM in DMSO) was from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), *RapiGest* SF surfactant was from Waters (Milford, MA, USA) and sequencing-grade modified trypsin was from Promega (Madison, WI, USA). Acetonitrile (ACN), ethanol absolute anhydrous (EtOH), trifluoroacetic acid (TFA), all LC-MS grade quality or higher, were obtained from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France). Protein Calibration Standard I (ProtMix) and Peptide Calibration Standard II (PepMix) were purchased from Bruker Daltonics (Germany). For all experiments, MilliQ water was used (Billerica, MA, USA).

Biological material

Spores of *Botrytis cinerea* isolated from the field and cryopreserved in 10% DMSO were provided by the La Dargoire Research Center (Bayer CropScience, France). All spores of *B. cinerea* used in this study were derived from the same initial batch. For each experiment, a cryotube was thawed and the stock solution of spores was diluted with sterile MilliQ water resulting in a final concentration of 1.5×10^5 spores per mL (sp/mL) in the presence of 0.1% DMSO. In order to have fresh fungal material, Falcon® culture petri dishes (Corning, NY, USA) containing PDA solid medium were inoculated with 150 μ L of the appropriate spore suspension. Culture dishes were left in the dark for seven days in an incubator (Memmert, Schwabach, Germany) maintained at 20°C and at 70% level of hygrometry. These parameters were defined as the culture conditions for all our experiments. To prepare a fresh spore solution, spores were harvested from one seven-day old culture dish using a Falcon® cell scraper (Corning), filtered on a Falcon® nylon 100 μ m cell strainer (Corning), counted twice with a Malassez chamber and adjusted to a final concentration of 500 sp/mL in minimal medium.

Antifungal assay

The bioactive peptide ETD151, provided by Dr. Philippe Bulet, was produced by high cell density fermentation of a modified *Saccharomyces cerevisiae* strain developed by the former company EntoMed S.A. (Illkirch, France) and preserved as a stock solution in saline buffer. ETD151 was desalted by solid phase extraction using Sep-Pak C₁₈ Classic Cartridges (Waters) following the manufacturer's instructions. Solutions from 250 to 0.49 µM of ETD151 were prepared in sterile MilliQ water. Antifungal assays on *B. cinerea* were performed in sterile 96-well plates (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland). To assess inhibition of mycelium growth, microplate wells were filled with 135 µL of the fresh suspension at 500 sp/mL prior to incubation in the conditions reported in the Biological material section. Addition of 15 µL of the ETD151 solutions, giving final concentrations of 25 to 0.049 µM, occurred three days later. The plate was gently shaken and incubated for four additional days. Evolution of the assay was monitored daily by absorbance measurement at 630 nm with an ELx808 microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA). The dose-response curve was generated with Microsoft Excel software and XLfit plug-in (release 5.4). Data were adjusted according to the "Dose-response one site – 205" model to determine the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀).

Fluorescence microscopy

A fresh spore solution at 1 x 10⁴ sp/mL was prepared in a 25% PDB medium as reported in the Biological material section and 200 µL were distributed in several microplate wells. Spores were supplemented with SYTOX Green (final concentration of 30 µM) prior to shaking and incubation for 24 hours. Young mycelia of *B. cinerea* were treated by addition of ETD151 at final concentrations of 0.78 and 3.12 µM before a new incubation period of 24 hours. Morphological changes were monitored in transmitted light (TransLight50, 30 ms exposure) with an ImageXpress Micro XL fully automated inverted microscope (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) equipped with a Plan Fluor ELWD 40x objective (Nikon). SYTOX Green fluorescence was observed with a Green Fluorescent Protein filter (excitation wavelength, 472 nm; emission wavelength, 520 nm; 100 ms exposure).

Sample preparation for proteomic studies

In a 96-well plate (TPP product), 135 μL of the fresh suspension at 500 sp/mL in minimum medium was distributed in six rows of 10 wells each. Mycelia were cultivated by maintaining the plate for three days in the growth conditions defined previously. Subsequently, 15 μL of sterile MilliQ water was added to the first row as an untreated control. The five other rows were treated with five different concentrations of ETD151, ranging from 3.12 μM to 0.19 μM final. The experimental plate was maintained for 24 hours in the previously described growth conditions until protein extraction. Each microplate was monitored daily by measuring the absorbance at 630 nm with the ELx808 microplate reader (BioTek).

Protein extraction

For each plate, the fungal material (mycelium) from each of the 60 wells was collected by manual pipetting. For each experimental condition (untreated or treated with different concentrations of ETD151), 10 individual wells of a same row were pooled into a single 1.5 mL Eppendorf tube and maintained on ice until use. The fungal material was pelleted by centrifugation for 4 min at 13,000 rpm and 4°C. The fungal pellet was washed twice by up-and-down pipetting with 1 mL of sterile MilliQ water before adding 1 mL of 70% EtOH. The washed mycelia were stored overnight at -80°C. The fungal material was disrupted using a Mill-Mix 20 system (Domel, Železniki, Slovenia). The mycelia were ground in 2-mL tubes filled with 0.5 mm zirconium oxide beads for 10 min at 30 Hz. After centrifugation for 4 min at 13,000 rpm and 4°C, the pellets were collected and dried under CentriVap vacuum (Labconco, Kansas City, MO, USA). Finally, the proteins were extracted by incubating the dried fungal pellet in the presence of 2 M acetic acid, prepared in 50% ACN, for 4 h at 4°C under gentle shaking. After incubation, the extracts were centrifuged for 4 min at 13,000 rpm and 4°C and the protein supernatants were stored at 4°C until use.

Sample preparation for MALDI mass spectrometry analyses

For MALDI MS analyses, a fresh solution of matrix was prepared by adding, up to saturation, a few mg of 4-HCCA in 1 mL of Biotyper solution (Bruker Daltonics) composed of 50% ACN and 2.5% TFA. The samples to be analyzed (0.5 μL) were spotted and immediately covered with 0.5 μL of the matrix solution on an MTP 96 polished steel MALDI target (Bruker Daltonics). Calibration of the instrument was performed using PepMix complemented with ProtMix. The sample spots were quickly dried under mild vacuum prior to analysis.

Molecular mass fingerprints of *B. cinerea* mycelium by MALDI-TOF mass spectrometry

Mass spectra from protein supernatants described in the Protein extraction section were acquired on an AutoFlex III Smartbeam instrument (Bruker Daltonics) using the FlexControl 3.4 software (Bruker Daltonics) in positive linear mode. The instrument was set up with the following parameters: 200 Hz laser at a 40% global attenuation offset, 20 kV source voltage 1, 18.5 kV source voltage 2, 9 kV lens voltage, 1.82 kV linear detector voltage, 140 ns of pulsed ion extraction delay and 600 Da detector gating. MALDI MS spectra were acquired at the mass range 600 to 18,000 m/z by summing two sets of 1,000 laser shots. Data were previewed using the FlexAnalysis 3.4 software (Bruker Daltonics) and reprocessed in mMass software⁴⁶ (version 5.5.0) Average spectra were generated from three selected biological replicates (from a pool of six), based on their fingerprint similarities and their intensities (maximum arbitrary intensity > 10,000). The average spectra were cropped from 1,500 to 16,000 m/z , baseline correction was performed with a relative offset of 100 and a precision of 40, along with a smoothing according to the Savitzky-Golay algorithm (window size 5.0 m/z in one cycle). The peaks were automatically picked using a signal-to-noise (S/N) ratio of 2.0, a picking height of 90 and an application of baseline. Finally, the average mass spectra were concomitantly and manually curated to select 100 representative ions. MALDI molecular mass fingerprints of *B. cinerea* extracts were compared within the mass range 1,500 to 16,000 m/z , and according to the concentration of ETD151.

Sample preparation for bottom-up proteomics

Proteins were digested using the modified procedure reported by Masson and colleagues⁴⁷. Briefly, the protein supernatants were dried under vacuum (Labconco), and then suspended with gentle shaking in an ammonium bicarbonate (ABC) buffer (50 mM, pH 7.5) supplemented with 0.1% *RapiGest* surfactant. The proteins were reduced with 280 mM dithiothreitol in ABC buffer for 30 min at 56°C in the dark prior to alkylation with 480 mM iodoacetamide in ABC buffer for 30 min at room temperature in the dark. Digestions were carried out for 1 h at 37°C by adding 0.5 µg of trypsin (0.1 µg/µL in ABC buffer). Following this initial digestion, 0.5 µg of trypsin was added before overnight incubation at 37°C. To stop proteolysis and cleave the *RapiGest* surfactant, samples were acidified with 8 µL of a 10% TFA and 20% ACN solution and incubated for 30 min at 37°C. Finally, samples were centrifuged for 10 min at 13,000 rpm at room temperature. The digests were transferred into injection vials (Agilent Technology, France) containing 5 µL of 2% ACN acidified with a solution of 0.1% TFA.

Proteomic analyses by nano-LC-ESI-MS/MS

Nano-LC-ESI-MS/MS instrumentation, software, chromatographic columns and other items were obtained from Thermo Fisher Scientific. Peptides were analyzed using an Ultimate 3000 nanoflow HPLC system coupled to a Q-Exactive Orbitrap high-resolution mass spectrometer, controlled by Xcalibur 2.2, Chromeleon Xpress 6.80 and Thermo QExactive Tune 2.5 software. Nano-LC separations were performed according to Pisani and colleagues⁴⁸. Briefly, the digests were loaded at a flow rate of 10 μ L/min for 6 min onto a PepMap 100 C₁₈ precolumn (300 μ m x 5 mm, 5 μ m) and separated at a flow rate of 300 nL/min onto an Acclaim PepMap 100 C₁₈ nanoviper column (75 μ m x 250 mm, 3 μ m) maintained at 35°C. Peptides were eluted using a multi-step linear gradient from 2% to 32% and from 32% to 65% ACN in 0.1% (v/v) formic acid for 94 min and 5 min, respectively. For MS analyses, the mass spectrometer was operating in positive mode and data-dependent acquisition. The instrument acquired a full-range MS scan from 380 to 2000 m/z (70,000 resolution, AGC target $3 \cdot 10^6$, maximum IT 200 ms) and then fragmented the top ten peptide ions in each cycle (17,500 resolution, AGC target $2 \cdot 10^5$, maximum IT 100 ms, intensity threshold $4 \cdot 10^4$, excluding charge-unassigned ions, Normalized Collision Energy 27). Parent ions were then excluded from MS/MS for the next 15 s. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE⁴⁹ partner repository with the dataset identifier PXD016740.

Databases searching and annotation

All MS and MS/MS spectral data were analyzed using Proteome Discoverer software (version 2.2.0.388, Thermo Fisher Scientific). Processing and consensus workflows were adapted from manufacturer's basic settings. The acquired MS/MS spectra were matched using the SEQUEST HT⁵⁰ search algorithm (University of Washington) against the EnsemblFungi⁵¹ *Botrytis cinerea* B05.10 protein sequence database (http://fungi.ensembl.org/Botrytis_cinerea). The release 42 downloaded on February 16, 2019 contains 13,749 entries. The spectrum identification considered the following parameters: trypsin as proteolytic enzyme with a maximum of two missed cleavages, 6 and 144 amino acids as minimum and maximum peptide lengths, and a tolerance of 10 ppm/0.02 Da for precursor and fragment masses, respectively. Cysteine carbamidomethylation was defined as a static modification. Methionine/tryptophan oxidation, serine/threonine/tyrosine phosphorylation and C-terminal amidation were defined as dynamic modifications. False

discovery rates (FDRs), referred to as q-values, and posterior error probabilities (PEPs) for peptide spectral matches (PSMs) were calculated and filtered in the Percolator node using a decoy database^{52,53}. Peptides and inferred proteins were respectively validated based on high-confidence (FDR < 1%) and medium-confidence criteria (FDR < 5%). Protein grouping was applied to regroup protein candidates covered by the same set or subset of inferred peptides under a representative 'master' protein. Annotations were implemented through Proteome Discoverer using Gene Ontology^{54,55} (biological process, molecular function, cellular compartment), protein families from Pfam⁵⁶ and biochemical pathway maps from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)⁵⁷.

Protein quantification and functional analysis

Label-free quantification was performed using the Proteome Discoverer software. Chromatographic alignment for LC/MS mapping features, created by the Minora Feature Detector for each individual file, was achieved with a maximum retention time shift of 10 min and a mass tolerance of 10 ppm. Protein abundance was determined on intensity of precursor ions of unique and razor peptides. Normalization was performed using the total peptide amount. Statistical significance was determined for all samples during Proteome Discoverer analysis using an ANOVA (Background-Based) test, and a p-value less than 0.05 was considered significant. An adjusted p-value was also calculated using the Benjamini-Hochberg method. Significantly modulated proteins were plotted on *B. cinerea* KEGG pathways using the Search&Color Pathway tool (KEGG Mapper)⁵⁸. The FungiDB database⁵⁹ (<https://fungidb.org>) was also used to collect additional functional data on *B. cinerea* proteins.

Activity of complex I/ III and II/III of the mitochondrial respiratory chain

Mitochondrial preparation

Two liters of fresh spores of *B. cinerea* were cultured in glucose yeast mycological peptone medium and incubated in Erlenmeyer flasks with stirring for 72h at 22°C. Mycelia were filtered through a 200 µm nylon cloth NITEX (Sefar AG, Heiden, Switzerland), before washing with MilliQ ice water, spinning and weighing. The following steps were performed in a cold room (4°C) to preserve functionality of mitochondria. Mycelia were resuspended in a 0.5 M sucrose/1 mM EDTA/0.3% BSA/20 mM MOPS wash buffer adjusted to pH 7.4. After addition of 5 mM cysteine, the mixture was ground with 1 mm glass beads for three cycles of 30 s with 1 min pauses to cool down the suspension. Fungal material was filtered on a 100 µm nylon

cloth (Sefar) and beads were rinsed with the washing buffer, prior to centrifugation of the filtrate for 10 min at 1,500 g. The supernatant was filtered on a 150 μm nylon cloth (Sefar) prior to centrifugation for 20 min at 15,000 g. The mitochondrial pellet was resuspended in the wash buffer and fractionated in 2-mL aliquots prior to purification on a 1.8 M/1.2 M sucrose gradient, involving centrifugation for 45 min at 36,000 g followed by slow deceleration. Purified mitochondrial fractions at the sucrose bilayer interface were diluted in the wash buffer and centrifuged for 15 min at 36,000 g. Pellets were combined prior to a new washing step to obtain a single purified fraction of mitochondria.

Measurement of inhibition of complex I/III and II/III by colorimetry

The activity of a molecule as a possible electron transport chain complex inhibitor was measured by a potassium ferricyanide-based colorimetric test⁶⁰ in the presence of α -ketoglutarate and succinate, substrates of complexes I and II, respectively. Viability of fresh mitochondria was evaluated in 96-well microplates (Greiner Bio One). For complex I, 3 μL of the purified fraction was diluted in 400 μL of Mix I solution (Material S1) before depositing 88 μL of this mixture into 4 control wells and adding the 0.05 M α -ketoglutarate substrate. After a 3-min incubation at room temperature, the absorbance was measured for 5 min at 405 nm (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices). Data was converted to a slope using a linear regression model. Complex II activity was evaluated in the same way using Mix II (Material S1) and the appropriate substrate. For this assay, the ETD151 peptide diluted in sterile Milli-Q water was compared to two standard inhibitors diluted in DMSO: antimycin A and boscalid. From a dilution range (factor of 3.5) prepared upstream, 2 μL of the molecule to test (50X) was deposited in a well containing 88 μL of fresh mitochondria in Mix I or Mix II, for complex I or complex II, respectively. Immediately for complex I or after 7 min of incubation for complex II, 10 μL of 0.05 M substrate were added before incubation for 3 min at room temperature. After a brief stirring, the mitochondrial activity was measured as previously described.

Results and Discussion

Fungal growth inhibition and morphological changes in *Botrytis cinerea*

Several antifungal defensins from insects, like heliomicin²³ and drosomycin¹⁵, or from plants, such as RsAFP2⁶¹ and VvAMP2⁶², have been reported to be active against *Botrytis cinerea* at a micromolar range. We have previously shown that ETD151 exhibits a broad-spectrum of activities against several yeasts and filamentous fungi²² at the micromolar range. However, ETD151 had not been tested on *B. cinerea*. In this study, the antifungal activity of ETD151 was assessed *in vitro* against three-day-old mycelia of *B. cinerea* prepared from a fresh spore solution. In our experimental conditions, growth inhibition reaches a maximum, 78% as measured by optical density, at 6.25 μM of ETD151 (Figure 1A). Based on this value, the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was estimated to be 0.59 μM .

The antifungal action of ETD151 was monitored by optical microscopy (Figure 1B). At 0.78 and 3.12 μM , ETD151 is able to promote lysis and the release of intracellular content at some points of the growing mycelium, preferentially at the apical end of the hyphae (Fig. 1B, b-c). Such a leakage of cytosolic material suggests a loss of the cell wall integrity. An equivalent observation has already been reported for heliomicin and drosomycin on *B. cinerea* spores, but for these molecules, comparatively weaker effectiveness against the mycelium was recorded²³. Thus, our data confirm the enhanced activity of ETD151 compared to heliomicin, the reference molecule.

To assess whether ETD151 is able to disturb membrane integrity/permeability, the SYTOX Green nucleic acid stain, a cell-impermeant fluorophore, was used. Compared to the control experiment (Fig. 1B, g), in the presence of ETD151, the dye penetrated locally the hyphae and emitted a green-fluorescent signal revealing a compromised plasma membrane (Fig. 1B, h-i). Even if the permeabilization of the fungal membrane has emerged as a trend in the antifungal mode of action of plant defensins^{32,63}, this can result from different mechanisms. The mode of action of defensins was long thought to result from unspecific membrane permeabilization or pore-formation. However, there is increasing evidences that permeabilization can result from the interaction with specific lipid receptors at the membrane⁶⁴, and/or that defensins could enter the cytoplasm without disrupting the membrane bilayer and interfere with an intracellular target⁶⁵. In the latter case, the membrane permeabilization appears as a secondary effect. In this study, we clearly showed the membrane perturbation of *B. cinerea*

mycelia treated with ETD151. Nevertheless, it remains unclear if ETD151 is internalized or if it remains outside the fungal cells.

In addition, ETD151 reduced hyphal elongation with a concomitant disorder in hyphal branching at both tested concentrations (Fig. 1B, e and f, respectively 0.78 and 3.12 μM). Development of the *B. cinerea* mycelium post-treatment highlights the fungistatic aspect of ETD151 activity and may explain the inhibition plateau observed with the fungal growth curve (Fig. 1A). Swelling of hyphae was also noticed with a particularly strong phenotype at 3.12 μM (Fig. 1B, f). These morphological changes defined ETD151 as a morphogenic defensin of *B. cinerea*. This is homologous to observations reported for several plant defensins (RsAFP2, HsAFP1, MsDef1) in filamentous fungi^{66–68} and confirms commonalities with the antifungal action of the insect defensins. Results obtained after this first series of analyses showed that there are perturbations of the mycelium physiology and morphology, as the optical microscopy pictures and the uptake of the SYTOX Green nucleic acid stain differed between all treatment conditions.

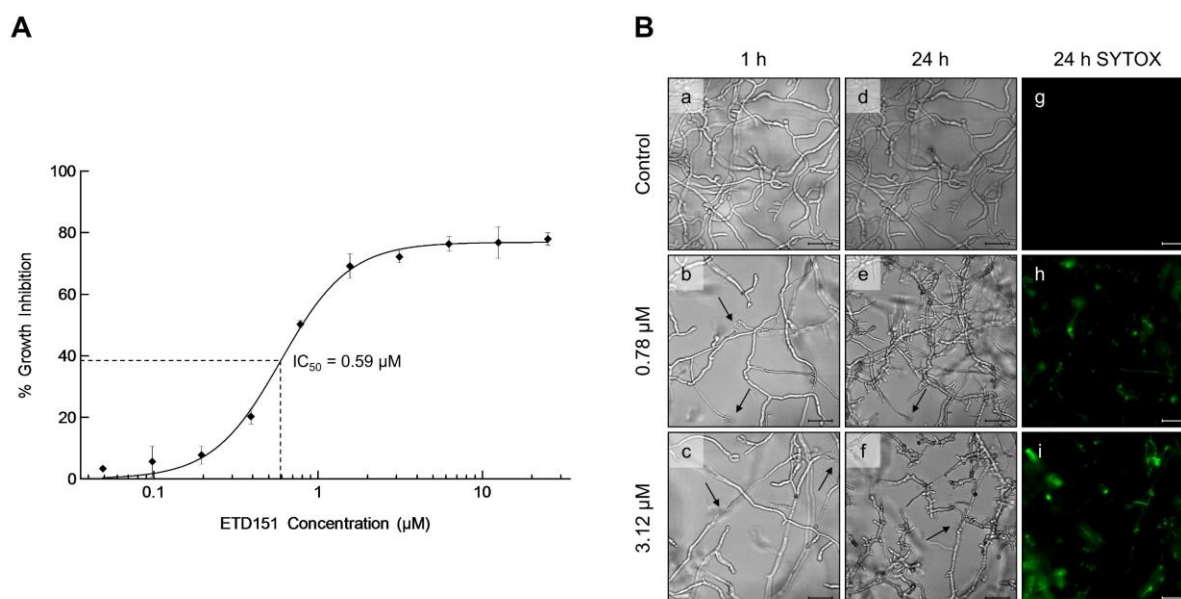


Figure 1: Growth inhibition and morphogenic alterations induced by ETD151 in *B. cinerea*

(A) Growth inhibition (%) was evaluated on *B. cinerea* three-day-old mycelia produced from fresh spores incubated in modified Tanaka. The dose-response curve was determined by incubating mycelia with ETD151 concentrations ranging from 0.049 to 25 μM (final concentration in \log_{10}) for four days. The dotted lines indicate the IC_{50} . Data are the means of triplicate measurements. Error bars denote standard deviation. (B) Morphogenic alterations of *B. cinerea* mycelia obtained from a fresh culture of spores were observed microscopically after one hour (a, b, c) and 24 h (d, e, f) of incubation in Potato Dextrose Broth diluted by 1/4th. Mycelia were incubated in the absence (control experiment, a, d) or the presence of ETD151 at a final concentration of 0.78 μM (b, e) and 3.12 μM (c, f). SYTOX Green signal was measured by fluorescence microscopy 24 h post-treatment (h, i) on the same experimental plate wells as the control experiment (g). Arrows indicate lysis of hyphae. Scale bar = 50 μm .

To study the antifungal effects of ETD151 on the intracellular protein content, we used a proteomics study based on a two-step MS workflow, and conducted on *B. cinerea* mycelial extracts. Firstly, a comparison of mass spectrometry molecular mass fingerprints (MFPs) was conducted by MALDI-MS within the mass range of 1,500 – 16,000 mass (m/z) range. Secondly, a bottom-up proteomics analysis by nano-LC-ESI-MS/MS was performed to identify and characterize the proteins changes. The concentration range from 0.19 to 3.12 μM , which includes the IC_{50} and covers the entire inhibition profile of ETD151, was adopted for a dose-response approach.

Protocol development to prepare *B. cinerea* mycelial extracts

Fungal culture, extraction and MALDI-MS analysis protocols have been developed for this study. The extraction protocol is inspired by the work of Schulthess and colleagues⁶⁹, using 35% formic acid for the BioTyping of clinical molds. The objective was to establish the optimal parameters for recording the most representative MALDI peptide signatures/MFPs of *B. cinerea*, with or without different concentrations of ETD151. The following parameters were reviewed: the starting concentration of *B. cinerea* spores, the mycelial culture duration in microplate, the treatment duration with ETD151 and the extraction process to generate mycelial extracts. The development of the protocols was focused on the conditions providing the most reproducible MFPs and with a rich molecular diversity. We settled on a starting concentration of 500 sp/mL prior to three days of growth in microplate and a 24h-treatment of the mycelia with ETD151. Peptides/proteins were extracted by grounding the mycelia with zirconium oxide beads, drying the pellet and incubating it in the presence of 2 M acetic acid solution prepared in 50% ACN (P. Bulet, Université Grenoble Alpes, personal communication, 2016). The different parameters for MALDI-MS analysis were optimized for an optimal detection (in terms of sensitivity, resolution, reproducibility and accuracy) of molecular ions between 1,500 and 16,000 m/z of the *B. cinerea* mycelial extracts.

Molecular mass fingerprints of *B. cinerea* mycelium in response to ETD151

Once the experimental methodology had been established, MALDI-MS analyses were performed directly on *B. cinerea* mycelial peptide/protein extracts, and restricted to peptides and small proteins (<20 kDa) as a preliminary approach to assess the antifungal effect of ETD151 at the molecular scale. Three-day-old mycelia were incubated for 24 h with the defensin following the previous concentration range, from 0.19 to 3.12 μM final concentrations. Average spectra (n=3) were generated from biological replicates to first, highlight modifications of the peptide/protein composition in the presence of ETD151 and second, visualize a putative dose-response effect (Figure 2). For each concentration, a manual selection from automatic peak labeling resulted in a representative peak list of 100 ions. Similarities between MALDI MFPs were calculated following the conservation of representative ions (Table S1).

In the presence of 0.19 μM of ETD151, no strict molecular change was observed on the MFPs (Fig. 2A). Compared to the untreated mycelia, MFPs were very similar with 91% identity. This observation is consistent with the very reduced growth inhibition effect (less than 10%) observed at this dose (Fig. 1A). From 0.39 μM of ETD151, the antifungal activity of ETD151 has a significant impact on the MFPs recorded (Fig. 2B). Several modifications were highlighted on the MFPs compared to untreated mycelia, with identity dropping to 68%. Differences in the peptide/protein profiles are significant in particular within the 6,000 – 9,000 mass range (Figure S1). At 0.39 μM , two sets of peptides/proteins within the 9,000 – 10,000 and 14,000 – 16,000 mass ranges emerged; those were not detectable in the control MFP or at an ETD151 concentration of 0.19 μM (Table S1).

At 0.39 μM or higher doses of ETD151, the MALDI-MS spectra showed similar overall MFPs (Fig. 2C). Indeed, the dose of 0.39 μM shares 92%, 84% and 77% identity with the 0.78, 1.56 and 3.12 μM doses, respectively. Several ions within the 9,000 – 10,000 and 14,000 – 16,000 mass ranges display intensity variation according to the concentration of the defensin with intensities increasing as the concentration reaches 3.12 μM (Table S1). These results suggest that MALDI-MS profiling could be a rapid and simple method to follow if an antifungal molecule as an effect on its fungal target. The modifications of the MFPs observed between the proteins extracted from the control experiment *versus* *B. cinerea* mycelia treated with different doses of ETD151 also revealed that ETD151 modified the peptide/protein profiles of *B. cinerea* mycelia, in a dose dependent manner up to a concentration that is more than the IC_{50} (0.59 μM).

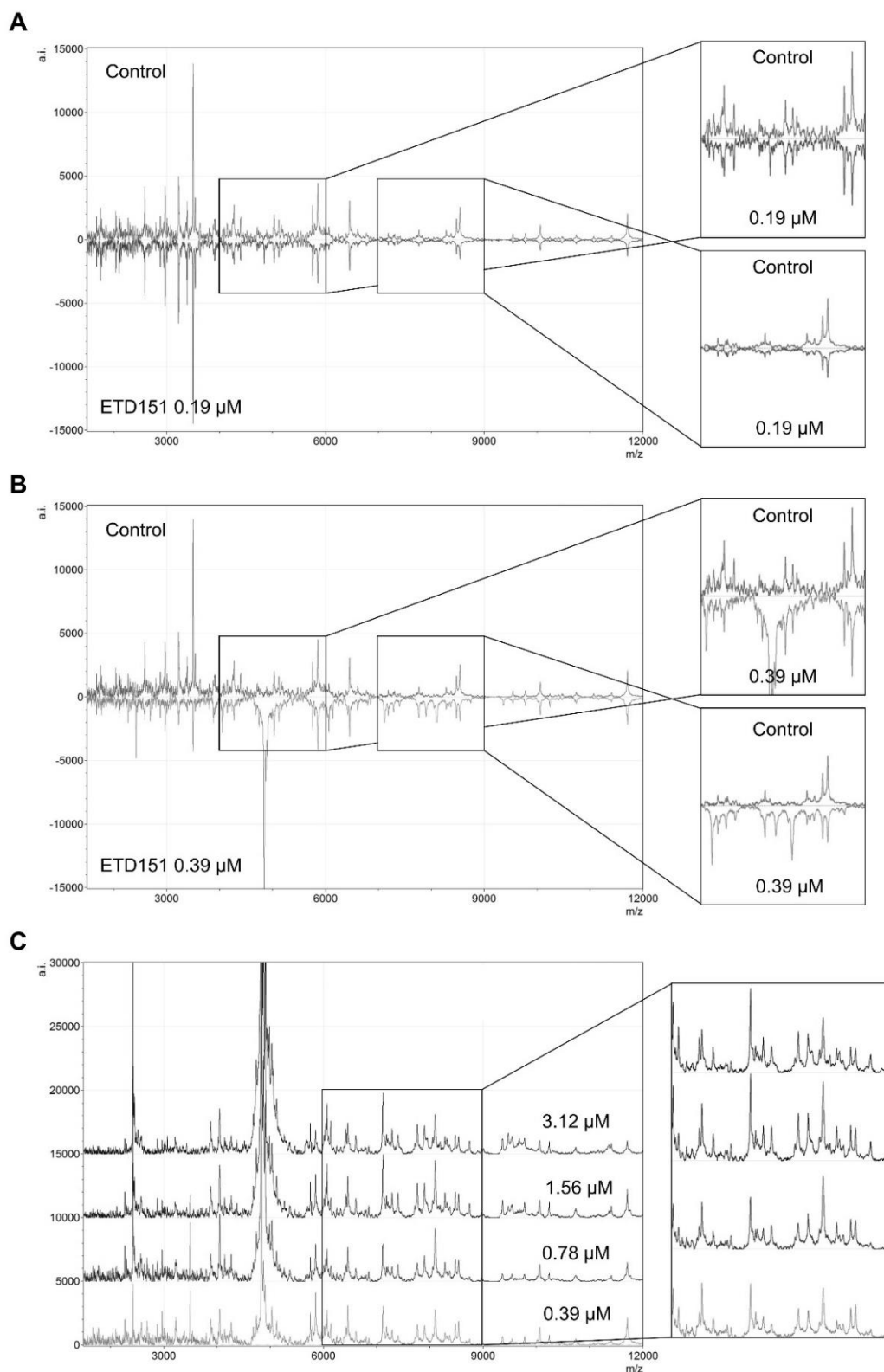


Figure 2: MALDI profiling of extracts of *B. cinerea* mycelia treated with ETD151

The MALDI mass spectra show the average MALDI-molecular mass fingerprint ($n=3$) from mycelial protein extracts treated or not with the antifungal peptide ETD151. The mass spectra are recorded in the 1,500 – 16,000 mass (m/z) range, for untreated mycelia (Control) *versus* mycelia treated with 0.19 μM ETD151 (A) and 0.39 μM ETD151 (B). Zooms show enlarged area at the 4,000 – 6,000 and 7,000 – 9,000 mass ranges. The mass spectra recorded when the mycelial cultures were treated with 0.39, 0.78, 1.56 and 3.12 μM ETD151 are also reported (C). The zoom shows the enlarged mass range (m/z) between 6,000 and 9,000.

Despite the extraction method used, including removal of the culture supernatant and two successive washing steps of the mycelia, the ion observed at m/z 4,839 corresponds to ETD151. It is worth mentioning that the intensity of this ion does not decrease with two additional washes (unpublished data). This suggests that in our experimental conditions, ETD151 was interacting with the membrane of the altered mycelium of *B. cinerea*, or was entering the mycelium. Note that the arbitrary intensity (a.i.) of the ETD151 ion increases with the concentration of ETD151 used, from 1.9×10^3 a.i. at $0.19 \mu\text{M}$ to 174×10^3 a.i. at $3.12 \mu\text{M}$ (Table S1).

As important modifications of the MFPs are observed within the highest molecular mass range detectable in our MALDI-MS conditions, this preliminary approach attests to the antifungal effect of ETD151 on *B. cinerea* and prompted us to analyze the mycelial extract of *B. cinerea* treated with ETD151 at the peptide/protein scale using a bottom-up proteomics approach.

Effect of ETD151 on *B. cinerea* mycelium by bottom-up proteomics

Differential proteomics analysis in response to ETD151

Our MALDI-MS results showed that the MFPs of the mycelial preparations are altered in response to the different concentrations of ETD151 used to treat *B. cinerea* mycelia. To have a better picture of the molecular response of *B. cinerea* mycelium upon our ETD151 treatment, we used gel- and detergent-free proteomics to monitor protein changes on mycelial extracts. *B. cinerea* mycelial peptide/protein acidic extracts prepared for MALDI-MS were dried under vacuum prior to reduction-alkylation-enzymatic digestion. *B. cinerea* protein digests were then analyzed by LC-ESI-MS/MS analysis as a conventional bottom-up proteomics approach. To evaluate the methodology implemented and validate our data analysis strategy, two sets of experiments were performed (Figure 3) allowing to generate two datasets (I and II). First, three individual cultures were harvested, following the same experimental procedure, from the collection of non-treated or treated cultures with different doses of ETD151 (Fig. 3A, dataset I). Second, a triplicate experiment was conducted on three individual plates with three-day-old mycelia (Fig. 3B, dataset II) originating from a unique culture of spores.

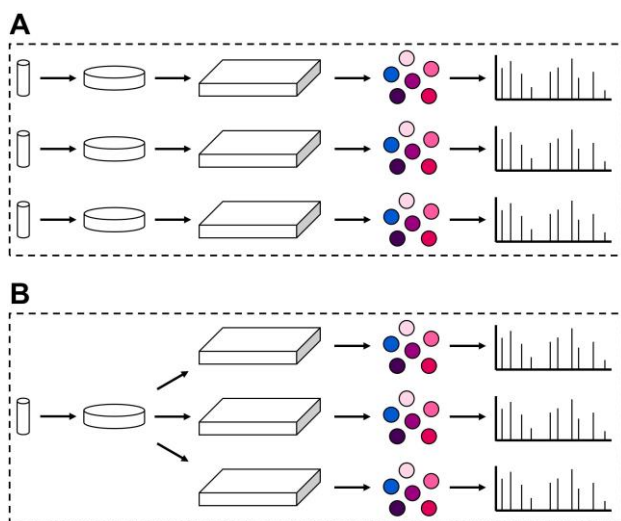


Figure 3: Workflow developed for the bottom-up proteomics approach on *B. cinerea*

Fresh fungal material was obtained from a calibrated stock solution of *B. cinerea* spores cultivated for seven days on a PDA medium. A fresh spore suspension was prepared and distributed in a 96-well plate prior to incubation. Three-day-old mycelia were treated with water (control experiment, blue) or with different concentrations of ETD151 (pink to purple gradient): 0.19 μM , 0.39 μM , 0.78 μM , 1.56 μM and 3.12 μM . After a 24h-incubation, mycelia were collected, and proteins were extracted. Samples were prepared for bottom-up proteomics and digests analyzed by LC-ESI-MS/MS prior to data processing. (A) The dataset I groups three individual cultures, while dataset II (B) is a triplicate experiment corresponding to three individual plates coming from a unique culture of spores.

Dataset I allowed the identification of 1,431 proteins with molecular masses ranging from 4.8 to 466 kDa. Among these proteins, 1,430 originate from *B. cinerea* while the last one corresponds to ETD151, detected by LC-ESI-MS/MS with 80% coverage (see raw data). We observed an increase in the number of inferred proteins in response to increasing concentrations of ETD151 (Figure 4A, diamond plots). The average number (Fig. 4A, black diamonds) of inferred proteins was 532 and 534 for control and 0.19 μM ETD151, respectively. This average number increased from 794 to 899 proteins when the cultures were treated from 0.39 to 3.12 μM ETD151, respectively. The increase in the number of proteins extracted in response to elevated concentrations of ETD151, may reflect a perturbation of the integrity of the cell membrane of the mycelium and/or the stimulation of the expressions of series of genes. It would corroborate microscopic data (Fig. 1B) that points to an antifungal effect of the defensin on *B. cinerea*. The reproducibility within dataset I was assessed for each concentration of ETD151 as the average ratio between the number of inferred proteins in each experiment and the number of recurrent proteins (Fig. 4A, histograms), as inferred in all three experiments. The reproducibility within the control experiment and after a treatment with 0.19 μM ETD151 was at $68 \pm 11 \%$ and $67 \pm 8 \%$, respectively. For 0.39 μM ETD151, it was $73 \pm 6 \%$, and for higher concentrations of ETD151, the reproducibility was 75 % with a standard

deviation $\leq 5\%$ (Fig. 4A, rectangle plots). Furthermore, a principal component analysis (PCA) was run on proteins of dataset I and showed a clustering of experiments according to the concentration of ETD151 (Figure 4B). Control and 0.19 μM samples were clearly separated from the other tested concentrations by the first component (42.8%). The first component (PC1, Fig. 4B) may reflect the molecular impact of ETD151 on the *B. cinerea* mycelium. Samples from 0.39 to 3.12 μM of ETD151 could not be separated according to the second component (PC2, 13.4%).

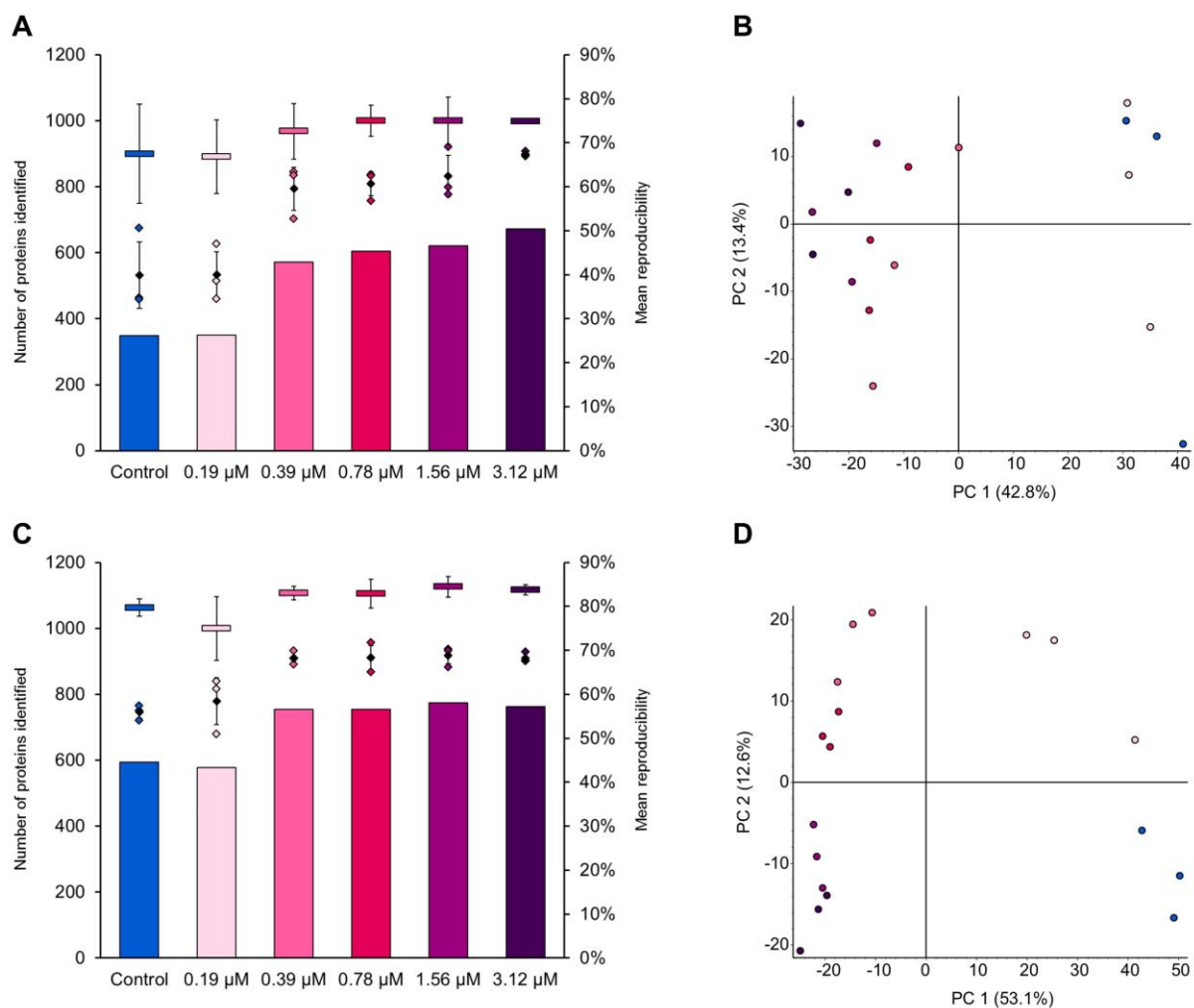


Figure 4: Protein identification of *B. cinerea* mycelial extracts and assessment of reproducibility

(A) The number of proteins inferred in samples of dataset I is shown according to the concentration of ETD151. Replicates and mean, along with the standard deviation, are represented by colored and black diamond-shape plots, respectively. Histograms indicate the number of recurrent proteins between all three replicates, the basis for calculation of reproducibility. Mean reproducibility is represented by colored rectangles, along with the standard deviation. (B) The Principal Component Analysis generated by Proteome Discoverer is shown for the 1,431 proteins inferred within dataset I. Experiments are visualized according to the concentration of ETD151 and the color code introduced previously. (C) The number of proteins inferred in samples of dataset II is reported according to the concentration of ETD151. Values are represented in the same way as dataset I, and data of the Principal Component Analysis generated for the 1,468 proteins inferred in dataset II are shown in (D).

Dataset II, a triplicate of three individual plates, inferred 1,468 proteins from a 4.8 to 466 kDa mass range. The goal of this experimental design was to estimate the impact of the initial culture of spores or of the harvest method on the reproducibility of the data. It should be noted that working simultaneously on three individual microplates significantly complexified the experimental protocol. Treatment of mycelia with ETD151, as well as the manual collection of samples from each microplate, should be completed within a very short period of time. As reported previously for dataset I, the average number of inferred proteins increased upon treatment with ETD151 (Figure 4C). As with dataset I, we observed an increase in the number of inferred proteins in response to increasing concentrations of ETD151 (Fig. 4C, diamond plots). The average numbers (Fig. 4C, black diamonds) of inferred proteins were 745 and 778 for the control and 0.19 μ M ETD151 samples, respectively. This average number increased from 910 to 917 proteins when the cultures were treated from 0.39 to 3.12 μ M ETD151 (Fig. 4C, diamond plots). The reproducibility was assessed in the same way as for dataset I (Fig. 4C, histograms). In the control and 0.19 μ M samples, the reproducibility was $80 \pm 2 \%$ and $75 \pm 7 \%$, respectively. For higher concentrations of ETD151, the reproducibility ranged from 83 to 84 % with a standard deviation $\leq 3 \%$. PCA was also run on dataset II (Figure 4D). As observed for dataset I, the first component (53.1 %) separated Control and 0.19 μ M samples from the other concentrations. Unlike the PCA on dataset I, the second component (12.6 %) allowed to separate the different samples according to the concentrations of ETD151. This new experimental design improved the robustness of the data as the average reproducibility between dataset I and II increased by 9% while the variability between replicates decreased, as reflected by the reduction in standard deviations. This explains the greater weight in our PCA analyses of the first component, at 43% and 53% in datasets I and II, respectively. Interestingly, in terms of the average number of inferred or recurrent proteins, the samples treated with 0.19 μ M ETD151 showed values closer to the control experiments (see above), which is supported by the clustering observed for control and 0.19 μ M ETD151 replicates. Although the results improved in dataset II, samples for 0.19 μ M ETD151 were the only ones with a reproducibility below 80% and a standard deviation $> 5\%$. This concentration of ETD151 appeared as an inflection point in the molecular effect of the antifungal peptide as the changes induced by ETD151 barely allow to distinguish control from 0.19 μ M samples. Finally, datasets I and II were grouped to consolidate data analysis. Indeed, both dataset shared similar properties on the increase in inferred and recurrent proteins for identical concentrations of ETD151, from 0.39 to 3.12 μ M.

The protein distributions were represented on a multidimensional Venn diagram⁷⁰ based on six-experimental datasets (untreated *versus* treated with five increasing concentrations of ETD151) (Figure 5). The Venn diagram is a simplified tool, free of statistical test, allowing to classify proteins from large datasets and to highlight groups of interest in our study. The diagram we obtained, allowed to represent the logical relations between the 1,592 summed proteins inferred in the merge of datasets I and II. Among these proteins, 42 were specifically found in the non-treated samples and 21 to 26 of them specifically in each concentration of ETD151 (21 in 0.19 μM , 22 in 0.39 μM , 24 in 0.78 μM and 26 in 1.56 μM). We found the most abundant number of specific proteins (44) when the mycelial culture was treated at 3.12 μM , the highest concentration of ETD151. Interestingly, as previously discussed, at the inflexion point, 82 proteins were found mutually in the control experiments and in samples treated with 0.19 μM ETD151. Overall, 676 proteins were observed to be common to all samples, 120 proteins were found in all treated samples, regardless of the concentration of ETD151, and 185 proteins were specifically found at the concentrations of 0.39 μM ETD151 and above. Our results demonstrated that ETD151 affected the molecular composition of *B. cinerea* mycelial samples and confirmed, over a wide mass range (4.8 – 466 kDa), the results presented previously by MALDI-MS MFPs up to 18 kDa. This comparative approach allows us to build an overview of the behavior of protein groups following treatment with the peptide and to select by label-free quantification characteristic proteins and metabolic pathways altered upon treatment with ETD151.

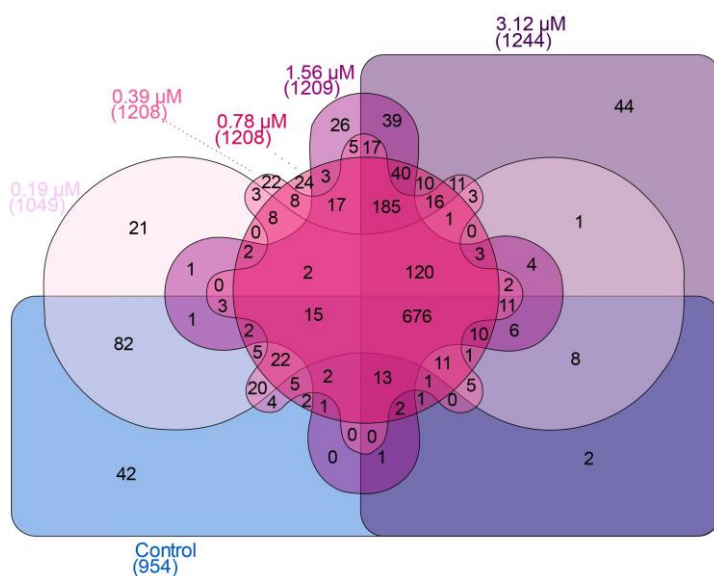


Figure 5: Multidimensional six-set Venn diagram

The Venn diagram generated on InteractiVenn (www.interactivenn.net) displays the 1,592 proteins from the merge of datasets I and II, according to their presence or absence in mycelia treated with increasing concentrations of ETD151 (pink to purple gradient): 0.19 μM , 0.39 μM , 0.78 μM , 1.56 μM and 3.12 μM .

Label-free quantification analysis

We inferred 1,592 proteins and among them, 1,559 were quantified according to a label-free approach. Abundance ratios and p-values were not calculated for 33 proteins. Significantly dysregulated proteins were selected with volcano plots according to a p-value ≤ 0.05 and a ± 2 -fold change (Figure S2). Volcano plots are commonly used to display the results of -omics experiments. This methodology allowed to highlight differentially abundant proteins in the presence of different concentrations of ETD151 (Figure 6A). Increasing concentrations of 0.19, 0.39, 0.78, 1.56 and 3.12 μM ETD151 resulted in the downregulation of 23, 56, 66, 73 and 85 proteins, respectively (light grey); and in the upregulation of 86, 173, 162, 158 and 162 proteins, respectively (dark grey). Statistical analysis determined that out of the 340 proteins inferred, 134 were significantly downregulated, and 204 were significantly upregulated (Figure 6B). Two proteins (Bcin02p06900, 40S ribosomal protein S20e, and Bcin12p02600, putative mitochondrial protein), were downregulated in the presence of 0.19 μM of ETD151 and upregulated at higher concentrations.

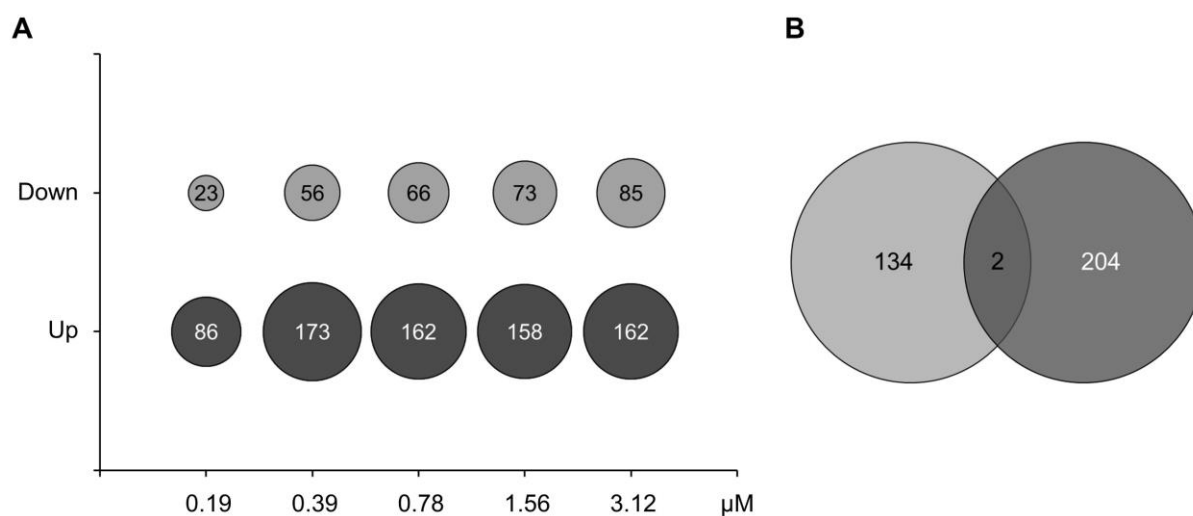


Figure 6: Significantly dysregulated proteins upon treatment of *B. cinerea* mycelium with ETD151

(A) Bubble chart summarizes the differentially abundant proteins with a ± 2 -fold change and a p-value ≤ 0.05 as detailed in volcano plots (Figure S2). (B) The Venn diagram pooling the two sets of proteins modulated upon treatment with ETD151. A total of 340 unique proteins are reported including 134 downregulated (light grey), 204 upregulated (dark grey) and two that were both down- and upregulated (intersecting of the two sets).

Gene ontology and network analysis

Proteins were annotated using ProteinCenter (Proteome Discoverer) to investigate molecular functions, biological processes, and cellular components from the Gene Ontology (GO) database (Figure 7). The molecular function-based categorization showed that among the 340 selected proteins, 168 (42%) could not be classified while the others were classified according to the GO terms as follow: 103 (26%) have catalytic activities (GO:0003824), 92 (23%) have binding properties (GO:0005488), 27 (7%) contribute to the structural integrity of a complex or its assembly within or outside a cell (GO:0005198), 7 (2%) act as transporters (e.g. lipids, proteins, oxygen) (GO:0005215), 4 (1%) are regulators of molecular functions (GO:0098772), and finally 2 (0.5%) were recognized as having antioxidant activity (GO:0016209) (Fig. 7A). Following the biological process-based categorization, 178 (49%) among the 340 proteins could not be classified. The most affected process is metabolism with 125 proteins (34%) (GO:0008152). The rest of the proteins are involved in biological processes such as (i) localization (21, 6%) (GO:0051179), (ii) regulation (15, 4%) (GO:0065007), (iii) cellular component organization (14, 4%) (GO:0071840), (iv) response to a stimulus (7, 2%) (GO:0050896), or (v) cellular process (2, 1%) (GO:0009987) (Fig. 7B).

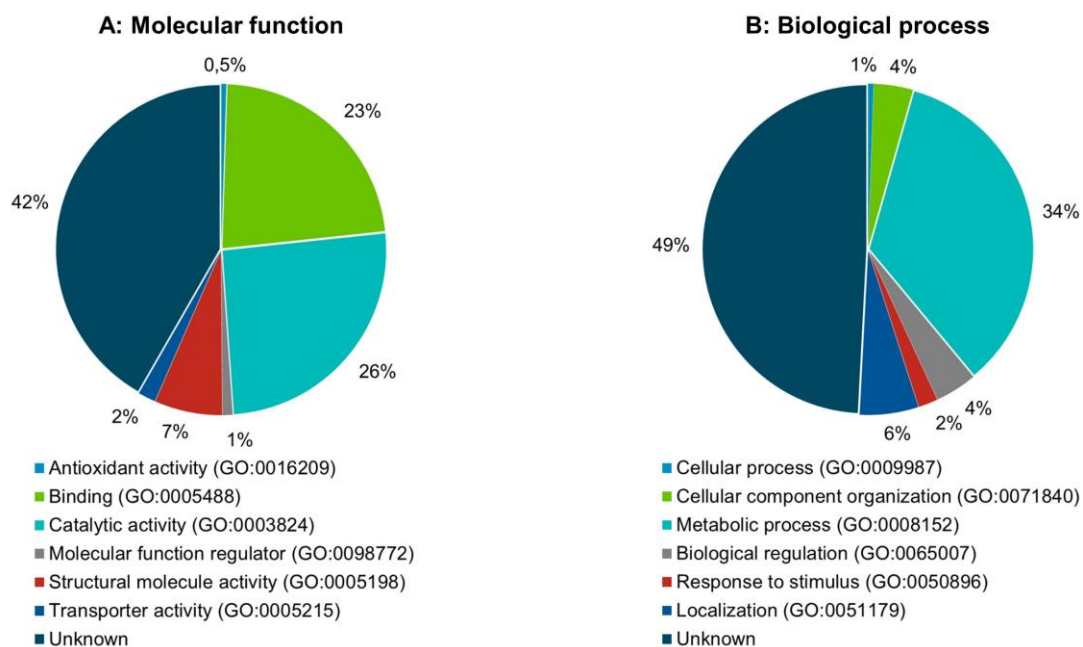


Figure 7: Gene Ontology of dysregulated proteins in *B. cinerea* mycelial extracts

Proteins selected (340) according to their differential abundance are categorized according to their (A) molecular function and (B) role in biological processes.

Molecular impact of ETD151 on *B. cinerea* pathways

Significantly modulated proteins upon treatment with ETD151 were searched in *Botrytis cinerea* KEGG pathways (117 pathways reported). From the 339 proteins (340 minus ETD151) previously selected, 106 were successfully mapped over 67 different pathways with a varied number of hits, from 1 to 38 matched proteins per map (Table S2). Pathways with less than five hits were not considered for further investigations, as a low number of matched proteins did not allow us to interpret their relevance in the mechanism of action of ETD151 on *B. cinerea*. Moreover, most of these maps were included in carbohydrate, lipid or amino acid metabolisms. Direct effects on these pathways had been evaluated by measuring the uptake and incorporation of radiolabeled precursors (¹⁴C-glucose, ³H-phenylalaline and ¹⁴C-acetate) by *Botrytis cinerea* spores in the presence of ETD151 (proprietary data from Bayer). ETD151 did not interfere with carbohydrate, protein and lipid biosynthesis confirming that modulated proteins in previously mentioned pathways resulted from global stress in response to an antifungal molecule. The following global pathway maps (metabolic pathways (bfu01100), biosynthesis of secondary metabolites (bfu1110), biosynthesis of antibiotics (bfu01130) and carbon metabolism (bfu01200) were also excluded from the analysis in favor of the study of specific maps. By considering the filters previously described, six pathways were impacted by the treatment, namely spliceosome (bfu03040), ribosome (bfu03010), protein processing in endoplasmic reticulum (bfu04141), endocytosis (bfu04144), MAPK signaling pathway (bfu04011), and oxidative phosphorylation (bfu00190).

The spliceosome pathway is a dynamic complex, located primarily within the nucleus of eukaryotic cells, which plays an essential role in the maturation process of mRNA. In our study, 27 proteins out of a total of 84 reported in the *B. cinerea* pathway were inferred, and 7 proteins were significantly dysregulated upon treatment with ETD151 (Figure S3). At our knowledge, there is no report in the literature of a direct effect of antifungal defensins on the spliceosome. Even if the molecular changes induced by ETD151 on this pathway are tricky to interpret, our data clearly show a dysregulation of this pathway.

The ribosome pathway was impacted too by the treatment of ETD151 and highlighted in this study. Ribosomes are essentially very complicated nano-factories for producing proteins. 80 proteins out of a total of 103 reported in the *B. cinerea* pathway were inferred. Upon treatment with ETD151, 25 ribosomal proteins were significantly modulated in both the small and large subunits including 24 up-regulated proteins, most of them at the starting concentration of 0.39 μ M of ETD151. Only one was found to be down-regulated (protein

Bcin14p02830/RPL3) from 0.39 μ M of ETD151. To our knowledge, there is no report in the literature concerning antifungal insect or plant defensins directly targeting protein biosynthesis in ribosomes. McColl and colleagues⁷¹ recently identified the *MRPS16* gene, coding for the mitochondrial ribosomal protein S16, among the genes having mutations linked to NaD1 plant defensin resistance in *S. cerevisiae*. However, the *B. cinerea* ortholog Bcin08p05120 was identified in our datasets as being non-significantly modulated. In this study, the modulation of ribosome-related subunits might reflect an attempt to keep protein synthesis at an optimal level as the presence of the antifungal defensin ETD151 disturbs protein biosynthesis and degradation.

The protein processing in the endoplasmic reticulum (ER) was also investigated. The ER is a continuous membrane system found within the cytoplasm of eukaryotic cells allowing for protein synthesis, folding, modification and in some cases transport to the Golgi apparatus through vesicles. Out of the total of 70 proteins reported in the *B. cinerea* pathway, 37 proteins were inferred in this study including seven significantly dysregulated upon treatment with ETD151 (Figure S4). These proteins play roles in the transport of proteins from the ER. Proteins that are located in the ER and/or Golgi apparatus, are interesting to highlight, as sphingolipids are synthesized in the ER and Golgi apparatus⁷². Thevissen and colleagues²⁸ demonstrated through an ELISA-based assay with *Pichia pastoris* that heliomicin and RsAFP2 interact with fungal membrane lipids called glucosylceramides. All of our structural and biological data support a common mechanism of action for heliomicin and ETD151, which lead us to suggest that ETD151 interacts with glucosylceramides too. Considering the impact of ETD151 treatment on the ER pathway, further investigation would be necessary to monitor an eventual direct effect of ETD151 on glucosylceramide biosynthesis and/or export. However, it is still unclear if ETD151 remains at the membrane and triggers a cascade of reactions leading to the fungal death, or if it is internalized. Intriguingly, one of the 6 pathways that we highlighted in this study is the endocytosis pathway.

Endocytosis is a cellular process in which substances (e.g. nutrients, plasma membrane proteins, lipids) are brought into the cell. In our study, 35 proteins, out of a total of 58 reported in this pathway for *B. cinerea*, were inferred. Upon treatment with ETD151, 7 proteins were significantly dysregulated (Figure S5). Three of them were upregulated in the presence of ETD151: Bcin13p05610/CAPZA capping protein (actin filament) muscle Z-line starting at a concentration of 0.19 μ M, Bcin11p01640/VPS26 and Bcin11p01920/VPS35 vacuolar protein sorting-associated protein at a concentration of 0.39 μ M. In contrast, four were

downregulated: Bcin01p06150/Arp2/3 actin related protein 2/3 complex subunit, at a concentration of 0.19 μM only, Bcin03p04970/Epsin membrane protein and Bcin13p04030/ArfGAP stromal membrane-associated protein starting at the concentration of 0.39 μM , and Bcin13p00990/Hrs hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate at the concentrations of 0.78 and 1.56 μM . These results could be valuable for future research on the mechanism of action of ETD151, and specifically the behavior of the antifungal defensin upon its interaction with the fungal membrane. Indeed, research on antifungal plant defensins demonstrated that for example MtDef4, Psd1 and NaD1 can be internalized by fungal cells upon interaction with a membrane partner³². MtDef4 and NaD1 internalization are energy dependent and require endocytosis in *Neurospora crassa*³³ and *Candida albicans*⁷³, respectively. Our hypothesis is that the dysregulation of endocytosis pathway observed after ETD151 treatment is correlated to its internalization, and/or a perturbation of membrane trafficking.

In order to overcome environmental stresses such as the addition of chemical fungicides and antifungal peptides, fungi, like other eukaryotes, rely on the rapid transduction of signals through the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. At lower concentrations, one or more stress response pathways are activated to respond to the cell damage. At higher concentrations, the fungal stress response leads to the inhibition of cell growth or induction of cell death. In our study, 23 proteins were inferred in the MAPK pathway, out of a total of 56 reported for *B. cinerea*. Upon treatment with ETD151, three proteins were dysregulated in the cell wall integrity (CWI) pathway (Figure S6): Bcin08p03780/Rom1,2 GDP-GTP exchange protein (down at 3.12 μM), Bcin02p06930/Fks2 1,3-beta glucan synthase (up starting from 0.19 μM) and Bcin16p00490/Cdc28 cyclin dependent kinase (up starting from 0.19 μM); one protein was dysregulated in the HOG pathway: Bcin16p04710/Tup1 general transcriptional corepressor (down starting from 0.39 μM). Several antifungal plant defensins³⁴ (e.g. RsAFP2, Psd1, MsDef1) are known to activate the MAPK pathway, with the CWI pathway, inducing changes to cell wall biogenesis, β -glucan synthesis and the organization of the actin cytoskeleton. The Defensin NaD1 activates the HOG pathway⁷³, leading to an increase in intracellular glycerol which provides protection against osmotic stress. In our study, we highlighted that the same pathways are activated to counteract the exposure to ETD151. Finally, oxidative phosphorylation is the last of the six pathways impacted by ETD151 treatment. Oxidative phosphorylation, coupling the cascade of oxidation-reduction of the mitochondrial respiratory chain and the phosphorylation of ADP to ATP, is an essential

metabolic pathway for the survival of most aerobic eukaryotic organisms. In our study, 60 out of a total of 72 reported proteins in the *B. cinerea* pathway were inferred (Figure 8A). Upon treatment with ETD151, two subunits of NADH dehydrogenase (complex I) Bcin08p06780/NDUFV1, Bcin08p01490/NDUFA8 were significantly up-regulated starting from a concentration of 0.39 μ M of ETD151 (Figure S7). Similarly, a subunit of succinate dehydrogenase (complex II) Bcin05p04430 was also up-regulated at 0.19 μ M of ETD151. By contrast, a subunit of ubiquinol-cytochrome c reductase (complex III) Bcin03p08370/QCR9 was significantly down-regulated at 0.19 μ M of ETD151. Finally, several subunits of F-type H⁺-transporting ATPase (complex V) were significantly modulated upon treatment: Bcin02p02510/epsilon (down at 0.19 μ M), Bcin10p01500/c (up starting at 0.39 μ M), Bcin02p02250/e (down at 3.12 μ M) and Bcin12p02610/k (down starting at 1.56 μ M). Our proteomics data suggested a mitochondrial dysfunction in the presence of the antifungal defensin ETD151. Mitochondrial dysfunction have been previously reported in the mechanism of action of the antifungal defensin HsAFP1⁷⁴. Moreover, Bleackley and colleagues have identified mitochondrial genes among the genes having mutations linked to NaD1-resistance in *S. cerevisiae*⁷⁵. To go further, the direct activity of ETD151 on complexes I to III of the mitochondrial respiratory chain was assessed and compared to boscalid and antimycin, two molecules providing reference profiles as inhibitors of succinate dehydrogenase and ubiquinol-cytochrome c reductase, respectively (Figure 8B). A colorimetric assay based on the reduction of ferricyanide allowed to measure combined activities of complexes I and III on the one hand, and complexes II and III on the other hand. The activity of boscalid demonstrated a partial inhibition (50%), when testing complexes I and III together, and a total inhibition, when testing complexes II and III together. The activity of antimycin A was characterized by a total inhibition in both associations of complexes. In the presence of ETD151, no inhibition was measured regardless of the tested complex, using up to 50 μ M of the antifungal defensin. This result demonstrated that ETD151 does not interact directly with complexes of the mitochondrial respiratory chain. Mitochondrial dysfunction highlighted by our proteomics data may result from mitochondrial membrane perturbation, reflecting a secondary effect of ETD151 disturbing cell membrane integrity.

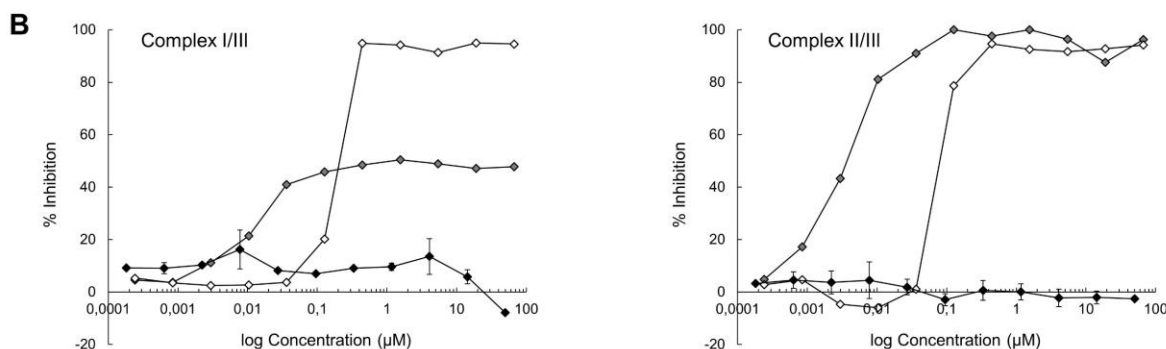
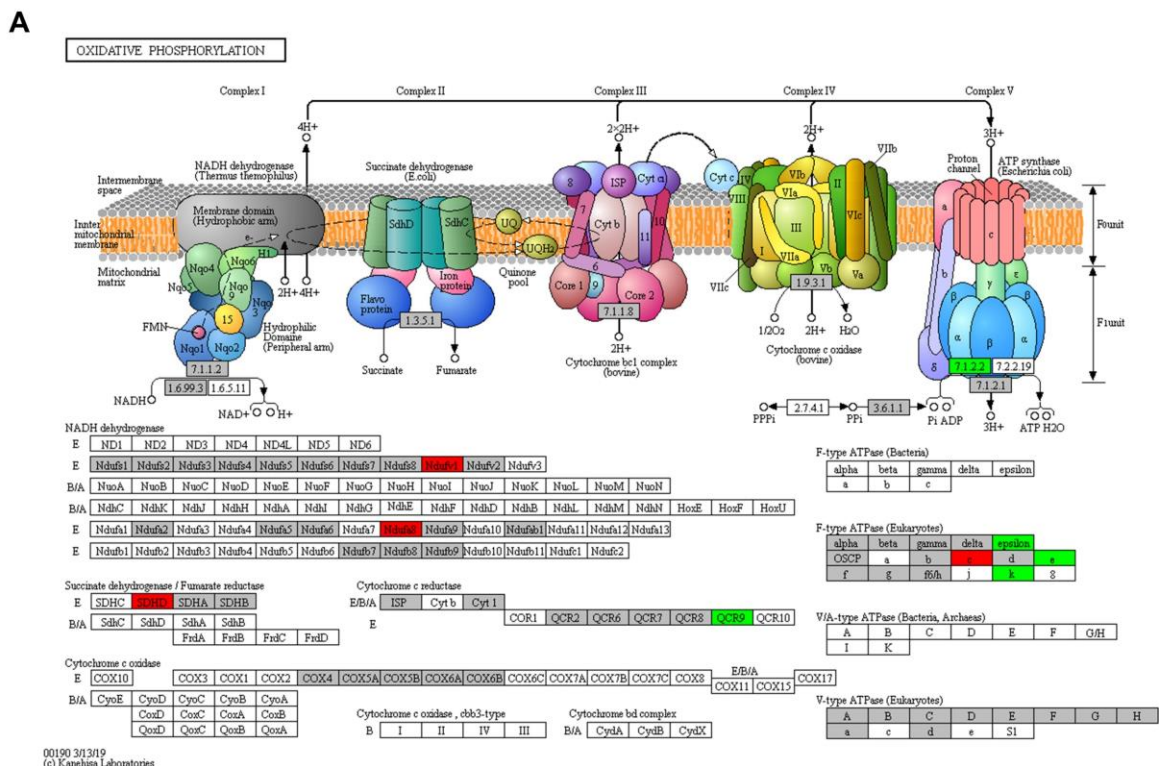


Figure 8: Effect of ETD151 on the *B. cinerea* mitochondrial chain respiration complex

(A) Mapping of dysregulated proteins upon treatment with ETD151 on the oxidative phosphorylation pathway (bfu00190) from the KEGG database. For *B. cinerea*, 72 proteins are reported on this map of which 60 were inferred in this study (grey). Eight differentially abundant proteins were found, upregulated (red) and downregulated (green). (B) Activity of ETD151 (black diamond), boscalid (grey diamond) and antimycin A (white diamond) on complex I/III and complex II/III of *B. cinerea* mitochondria. Results for ETD151 are expressed as the average of a duplicate experiment along with standard deviation.

Conclusions and Perspectives

Proteomics could offer a way to improve the research strategy into the resolution of antifungal mechanisms of action by targeting preferentially involved proteins or metabolic pathways. Through this study, we developed an experimental workflow to evaluate changes in the peptide and protein contents of mycelial extracts of the phytopathogenic fungus *B. cinerea* in response to different concentrations of the antifungal peptide ETD151. As an initial approach, molecular mass fingerprints (MFPs) by MALDI profiling allowed to highlight molecular changes in *B. cinerea* mycelia treated with ETD151. Even with spectra obtained on a partial mass range (<20 kDa), it could be valuable to compare average MFPs in the presence of ETD151 to spectra generated with other antifungal defensins. While MALDI profiling allows to identify changes at the molecular level, it does not allow to characterize the identified molecules and to observe the variation in the proteins over the mass range we covered by MALDI profiling. In a second step of our approach, bottom-up proteomics analyses of mycelial extracts provided robust and reproducible data, necessary to study in-depth molecular changes induced by ETD151 on *B. cinerea*. Our analyses highlighted 340 significantly modulated proteins upon treatment with ETD151 and revealed six pathways impacted by the antifungal defensin, namely spliceosome, ribosome, protein processing in endoplasmic reticulum, endocytosis, MAPK signaling pathway, and oxidative phosphorylation. Some of these dysregulated pathways were already reported to be impacted by antifungal plant defensins such as HsAFP1, which induces mitochondrial dysfunction in *C. albicans*. In our study, we clearly demonstrated that there was no direct effect of ETD151 on the *B. cinerea* mitochondrial respiration chain. Moreover, our data highlighted that ETD151 activates a part of the CWI (MAPK) pathway, such as the plant defensin RsAFP2 in *C. albicans*. This result, as well as morphological alterations observed by microscopy, reinforces the idea that RsAFP2 and heliomycin-related peptides, including ETD151, share a close mechanism of action. The first step of this mechanism is hypothesized to be the interaction with lipid components of the fungal membrane, specifically glucosylceramides. Thus, our next objective is to dissect the molecular interactions between ETD151 and glucosylceramides.

Supporting Information

The following files are available free of charge.

Material S1: Composition of reaction mix for the activity test on respiratory chain complex

Figure S1: Distribution of MALDI-MS ions in *B. cinerea* mycelium fingerprints

Figure S2: Volcano plots depicting significantly dysregulated *B. cinerea* proteins in the presence of ETD151

Figure S3: Mapping of dysregulated proteins on *B. cinerea* spliceosome pathway

Figure S4: Mapping of dysregulated proteins on *B. cinerea* protein processing pathway

Figure S5: Mapping of dysregulated proteins on *B. cinerea* endocytosis pathway

Figure S6: Mapping of dysregulated proteins on *B. cinerea* MAPK signaling pathway

Figure S7: Mapping of dysregulated proteins on *B. cinerea* oxidative phosphorylation pathway

Table S1: MALDI-MS fingerprinting of *B. cinerea* mycelial extracts (.xlsx)

Table S2: List of KEGG *B. cinerea* pathways with significantly dysregulated proteins (.xlsx)

Author Contributions

Idea and design of the study: PB, CL, TK.

Mass spectrometric analysis: TA, PB, SV.

Pathway analysis: TA, TK, PB.

Statistical analysis: TA, TK, PB, SV.

Drafting the manuscript: TA, PB, CL, TK.

Review of manuscript for important intellectual content: all authors.

Conflicts of Interest:

The authors declare no conflicts of interest.

Notes

All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Acknowledgments & Funding Sources

This work was supported by the Convention Industrielle de Formation par la Recherche CIFRE n°2015/1111 – through the research contract between Bayer SAS, the French National Centre for Scientific Research (CNRS, CBM UPR 4301 and IAB UMR 5309, France) and Research and Development from the Association Plateforme BioPark of Archamps (France). We thank our

colleagues: Dr Karim Arafah and Victor Masson, in the MassOmics group of the Association Plateforme BioPark of Archamps, for providing knowledge in LC-ESI-MS/MS and data processing, and in the preparation and processing of mycelial extracts, respectively. We also thank Stephane Peyrard and Catherine Sirven from Computational Life Science group in the La Dargoire Research Center (Bayer SAS, Lyon), for providing their expertise in protein annotation and data processing, respectively.

References

- (1) Pennisi, E. Armed and Dangerous. *Science* **2010**, *327* (5967), 804–805. <https://doi.org/10.1126/science.327.5967.804>.
- (2) Fisher, M. C.; Henk, D. A.; Briggs, C. J.; Brownstein, J. S.; Madoff, L. C.; McCraw, S. L.; Gurr, S. J. Emerging Fungal Threats to Animal, Plant and Ecosystem Health. *Nature* **2012**, *484* (7393), 186–194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>.
- (3) Williamson, B.; Tudzynski, B.; Tudzynski, P.; van Kan, J. A. L. Botrytis Cinerea: The Cause of Grey Mould Disease. *Mol. Plant Pathol.* **2007**, *8* (5), 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>.
- (4) van Kan, J. A. L. Licensed to Kill: The Lifestyle of a Necrotrophic Plant Pathogen. *Trends Plant Sci.* **2006**, *11* (5), 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.03.005>.
- (5) Dean, R.; van Kan, J. A. L.; Pretorius, Z. A.; Hammond-Kosack, K. E.; Pietro, A. D.; Spanu, P. D.; Rudd, J. J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; et al. The Top 10 Fungal Pathogens in Molecular Plant Pathology. *Mol. Plant Pathol.* **2012**, *13* (4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>.
- (6) Hahn, M. The Rising Threat of Fungicide Resistance in Plant Pathogenic Fungi: Botrytis as a Case Study. *J. Chem. Biol.* **2014**, *7* (4), 133–141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>.
- (7) Lucas, J. A.; Hawkins, N. J.; Fraaije, B. A. Chapter Two - The Evolution of Fungicide Resistance. In *Advances in Applied Microbiology*; Sariaslani, S., Gadd, G. M., Eds.; Academic Press, 2015; Vol. 90, pp 29–92.
- (8) Nicot, P. C.; Stewart, A.; Bardin, M.; Elad, Y. Biological Control and Biopesticide Suppression of Botrytis-Induced Diseases. In *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*; Fillinger, S., Elad, Y., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 165–187. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_9.
- (9) Brown, K. L.; Hancock, R. E. Cationic Host Defense (Antimicrobial) Peptides. *Curr. Opin. Immunol.* **2006**, *18* (1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.004>.
- (10) Cornet, B.; Bonmatin, J.-M.; Hetru, C.; Hoffmann, J. A.; Ptak, M.; Vovelle, F. Refined Three-Dimensional Solution Structure of Insect Defensin A. *Structure* **1995**, *3* (5), 435–448. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00177-0).
- (11) Zhu, S.; Gao, B.; Tytgat, J. Phylogenetic Distribution, Functional Epitopes and Evolution of the CS α Superfamily. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2005**, *62* (19–20), 2257–2269. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5200-6>.
- (12) Shafee, T. M. A.; Lay, F. T.; Hulett, M. D.; Anderson, M. A. The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33* (9), 2345–2356. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw106>.
- (13) Vriens, K.; Cammue, B. P. A.; Thevissen, K. Antifungal Plant Defensins: Mechanisms of Action and Production. *Molecules* **2014**, *19* (8), 12280–12303. <https://doi.org/10.3390/molecules190812280>.
- (14) Bulet, P.; Stöcklin, R. Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation. *Protein Pept. Lett.* **2005**, *12* (1), 3–11.
- (15) Fehlbaum, P.; Bulet, P.; Michaut, L.; Lagueux, M.; Broekaert, W. F.; Hetru, C.; Hoffmann, J. A. Insect Immunity: Septic Injury of Drosophila Induces the Synthesis of a Potent Antifungal Peptide with Sequence Homology to Plant Antifungal Peptides. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (52), 33159–33163.

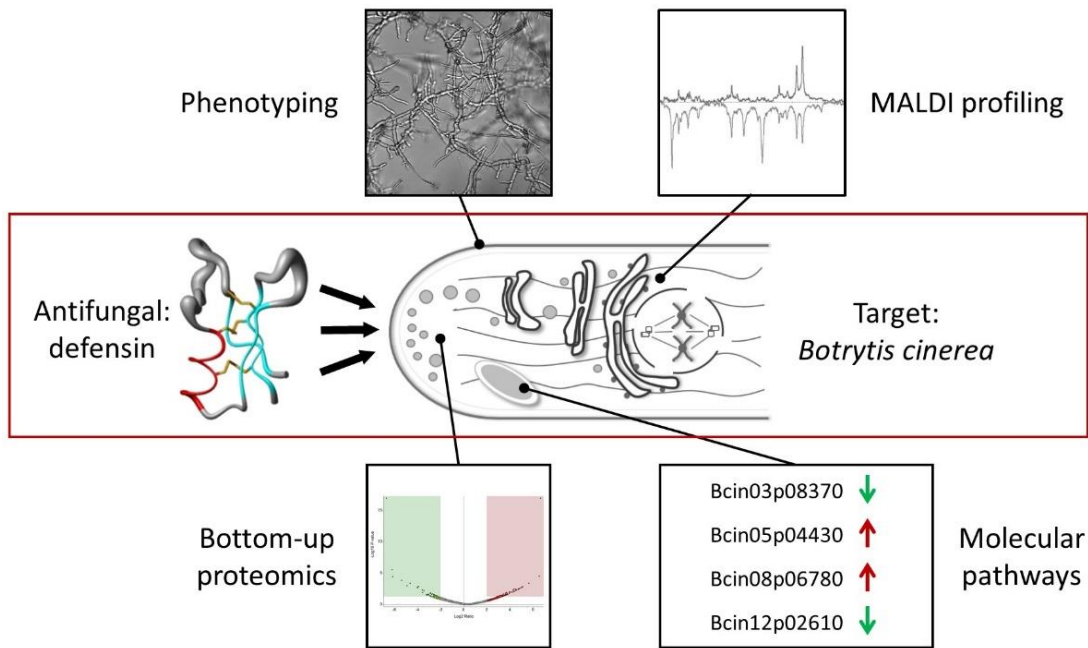
- (16) Landon, C.; Sodano, P.; Hetru, C.; Hoffmann, J.; Ptak, M. Solution Structure of Drosomycin, the First Inducible Antifungal Protein from Insects. *Protein Sci.* **1997**, *6* (9), 1878–1884. <https://doi.org/10.1002/pro.5560060908>.
- (17) Lamberty, M.; Ades, S.; Uttenweiler-Joseph, S.; Brookhart, G.; Bushey, D.; Hoffmann, J. A.; Bulet, P. Insect Immunity: Isolation from the Lepidopteran *Heliothis virescens* of a Novel Insect Defensin with Potent Antifungal Activity. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (14), 9320–9326. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9320>.
- (18) Lamberty, M.; Caille, A.; Landon, C.; Tassin-Moindrot, S.; Hetru, C.; Bulet, P.; Vovelle, F. Solution Structures of the Antifungal Heliomicin and a Selected Variant with Both Antibacterial and Antifungal Activities. *Biochemistry* **2001**, *40* (40), 11995–12003. <https://doi.org/10.1021/bi0103563>.
- (19) Lamberty, M.; Zachary, D.; Lanot, R.; Bordereau, C.; Robert, A.; Hoffmann, J. A.; Bulet, P. Insect Immunity. Constitutive Expression of a Cysteine-Rich Antifungal and a Linear Antibacterial Peptide in a Termite Insect. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (6), 4085–4092. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002998200>.
- (20) Da Silva, P.; Jouvensal, L.; Lamberty, M.; Bulet, P.; Caille, A.; Vovelle, F. Solution Structure of Termicin, an Antimicrobial Peptide from the Termite *Pseudacanthotermes spiniger*. *Protein Sci.* **2003**, *12* (3), 438–446. <https://doi.org/10.1110/ps.0228303>.
- (21) Schuhmann, B.; Seitz, V.; Vilcinskas, A.; Podsiadlowski, L. Cloning and Expression of Gallerimycin, an Antifungal Peptide Expressed in Immune Response of Greater Wax Moth Larvae, *Galleria mellonella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2003**, *53* (3), 125–133. <https://doi.org/10.1002/arch.10091>.
- (22) Landon, C.; Barbault, F.; Legrain, M.; Menin, L.; Guenneugues, M.; Schott, V.; Vovelle, F.; Dimarcq, J.-L. Lead Optimization of Antifungal Peptides with 3D NMR Structures Analysis. *Protein Sci.* **2004**, *13* (3), 703–713. <https://doi.org/10.1110/ps.03404404>.
- (23) Banzet, N.; Latorse, M.-P.; Bulet, P.; François, E.; Derpierre, C.; Dubald, M. Expression of Insect Cystein-Rich Antifungal Peptides in Transgenic Tobacco Enhances Resistance to a Fungal Disease. *Plant Sci.* **2002**, *162* (6), 995–1006. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00053-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00053-5).
- (24) Thevissen, K.; Kristensen, H.-H.; Thomma, B. P. H. J.; Cammue, B. P. A.; François, I. E. J. A. Therapeutic Potential of Antifungal Plant and Insect Defensins. *Drug Discov. Today* **2007**, *12* (21), 966–971. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.07.016>.
- (25) Andrès, E. Cationic Antimicrobial Peptides in Clinical Development, with Special Focus on Thanatin and Heliomicin. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *31* (6), 881–888. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1430-8>.
- (26) Halpern, N. Entomede mise sur le système immunitaire des insectes pour soigner l'homme. *Les Echos*. December 11, 2001.
- (27) Aerts, A. M.; François, I. E. J. A.; Cammue, B. P. A.; Thevissen, K. The Mode of Antifungal Action of Plant, Insect and Human Defensins. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65* (13), 2069–2079. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8035-0>.
- (28) Thevissen, K.; Warnecke, D. C.; François, I. E. J. A.; Leipelt, M.; Heinz, E.; Ott, C.; Zähringer, U.; Thomma, B. P. H. J.; Ferket, K. K. A.; Cammue, B. P. A. Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (6), 3900–3905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311165200>.
- (29) Landon, C.; Vovelle, F.; Sodano, P.; Pajon, A. The Active Site of Drosomycin, a Small Insect Antifungal Protein, Delineated by Comparison with the Modeled Structure of Rs-AFP2, a Plant Antifungal Protein. *J. Pept. Res.* **2000**, *56* (4), 231–238. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2000.00757.x>.
- (30) Gao, B.; Zhu, S.-Y. Differential Potency of Drosomycin to *Neurospora crassa* and Its Mutant: Implications for Evolutionary Relationship between Defensins from Insects and Plants. *Insect Mol. Biol.* **2008**, *17* (4), 405–411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2008.00810.x>.
- (31) Rautenbach, M.; Troskie, A. M.; Vosloo, J. A. Antifungal Peptides: To Be or Not to Be Membrane Active. *Biochimie* **2016**, *130*, 132–145. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.05.013>.

- (32) Cools, T. L.; Struyfs, C.; Cammue, B. P.; Thevissen, K. Antifungal Plant Defensins: Increased Insight in Their Mode of Action as a Basis for Their Use to Combat Fungal Infections. *Future Microbiol.* **2017**, *12* (5), 441–454. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0181>.
- (33) El-Mounadi, K.; Islam, K. T.; Hernández-Ortiz, P.; Read, N. D.; Shah, D. M. Antifungal Mechanisms of a Plant Defensin MtDef4 Are Not Conserved between the Ascomycete Fungi *Neurospora Crassa* and *Fusarium Graminearum*. *Mol. Microbiol.* **2016**, *100* (3), 542–559. <https://doi.org/10.1111/mmi.13333>.
- (34) Parisi, K.; Shafee, T. M. A.; Quimbar, P.; van der Weerden, N. L.; Bleackley, M. R.; Anderson, M. A. The Evolution, Function and Mechanisms of Action for Plant Defensins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.02.004>.
- (35) Amselem, J.; Cuomo, C. A.; van Kan, J. A. L.; Viaud, M.; Benito, E. P.; Couloux, A.; Coutinho, P. M.; Vries, R. P. de; Dyer, P. S.; Fillinger, S.; et al. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia Sclerotiorum* and *Botrytis Cinerea*. *PLOS Genet.* **2011**, *7* (8), e1002230. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002230>.
- (36) González-Fernández, R.; Aloria, K.; Valero-Galván, J.; Redondo, I.; Arizmendi, J. M.; Jorrín-Novo, J. V. Proteomic Analysis of Mycelium and Secretome of Different *Botrytis Cinerea* Wild-Type Strains. *J. Proteomics* **2014**, *97*, 195–221. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.06.022>.
- (37) van Kan, J. A. L.; Stassen, J. H. M.; Mosbach, A.; Lee, T. A. J. V. D.; Faino, L.; Farmer, A. D.; Papatirou, D. G.; Zhou, S.; Seidl, M. F.; Cottam, E.; et al. A Gapless Genome Sequence of the Fungus *Botrytis Cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* **2017**, *18* (1), 75–89. <https://doi.org/10.1111/mpp.12384>.
- (38) Staats, M.; van Kan, J. A. L. Genome Update of *Botrytis Cinerea* Strains B05.10 and T4. *Eukaryot. Cell* **2012**, *11* (11), 1413–1414. <https://doi.org/10.1128/EC.00164-12>.
- (39) Liñeiro, E.; Cantoral, J. M.; Fernández-Acero, F. J. Contribution of Proteomics Research to Understanding *Botrytis* Biology and Pathogenicity. In *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*; 2016; pp 315–333.
- (40) Fernández-Acero, F. J.; Jorge, I.; Calvo, E.; Vallejo, I.; Carbú, M.; Camafeita, E.; Garrido, C.; López, J. A.; Jorrin, J.; Cantoral, J. M. Proteomic Analysis of Phytopathogenic Fungus *Botrytis Cinerea* as a Potential Tool for Identifying Pathogenicity Factors, Therapeutic Targets and for Basic Research. *Arch. Microbiol.* **2007**, *187* (3), 207–215. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0188-3>.
- (41) González-Fernández, R.; Valero-Galván, J.; Gómez-Gálvez, F. J.; Jorrín-Novo, J. V. Unraveling the in Vitro Secretome of the Phytopathogen *Botrytis Cinerea* to Understand the Interaction with Its Hosts. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00839>.
- (42) Shah, P.; Atwood, J. A.; Orlando, R.; El Mubarek, H.; Podila, G. K.; Davis, M. R. Comparative Proteomic Analysis of *Botrytis Cinerea* Secretome. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (3), 1123–1130. <https://doi.org/10.1021/pr8003002>.
- (43) Hou, Y.; Zheng, Z.; Xu, S.; Chen, C.; Zhou, M. Proteomic Analysis of *Fusarium Graminearum* Treated by the Fungicide JS399-19. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2013**, *107* (1), 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.05.009>.
- (44) Tanaka, S. Nutrition of *Piricularia Oryzae* in Vitro. In *The rice blast disease*; IRRI-Johns Hopkins Press: Baltimore, MD, 1965; pp 23–34.
- (45) Ou, S. H. *Rice Diseases*, 2nd ed.; Commonwealth Mycological Institute: Kew, Surrey, UK, 1985.
- (46) Strohal, M.; Kavan, D.; Novák, P.; Volný, M.; Havlíček, V. MMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (11), 4648–4651. <https://doi.org/10.1021/ac100818g>.
- (47) Masson, V.; Arafah, K.; Voisin, S.; Bulet, P. Comparative Proteomics Studies of Insect Cuticle by Tandem Mass Spectrometry: Application of a Novel Proteomics Approach to the Pea Aphid Cuticular Proteins. *PROTEOMICS* **2018**, *18* (3–4), 1700368. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700368>.

- (48) Pisani, C.; Voisin, S.; Arafah, K.; Durand, P.; Perrard, M.-H.; Guichaoua, M.-R.; Bulet, P.; Prat, O. Ex Vivo Assessment of Testicular Toxicity Induced by Carbendazim and Iprodione, Alone or in a Mixture. *ALTEX - Altern. Anim. Exp.* **2016**, *33* (4), 393–413. <https://doi.org/10.14573/altex.1601253>.
- (49) Perez-Riverol, Y.; Csordas, A.; Bai, J.; Bernal-Llinares, M.; Hewapathirana, S.; Kundu, D. J.; Inuganti, A.; Griss, J.; Mayer, G.; Eisenacher, M.; et al. The PRIDE Database and Related Tools and Resources in 2019: Improving Support for Quantification Data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (D1), D442–D450. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1106>.
- (50) Eng, J. K.; McCormack, A. L.; Yates, J. R. An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5* (11), 976–989. [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(94\)80016-2](https://doi.org/10.1016/1044-0305(94)80016-2).
- (51) Kersey, P. J.; Allen, J. E.; Allot, A.; Barba, M.; Boddu, S.; Bolt, B. J.; Carvalho-Silva, D.; Christensen, M.; Davis, P.; Grabmueller, C.; et al. Ensembl Genomes 2018: An Integrated Omics Infrastructure for Non-Vertebrate Species. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (D1), D802–D808. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1011>.
- (52) Käll, L.; Canterbury, J. D.; Weston, J.; Noble, W. S.; MacCoss, M. J. Semi-Supervised Learning for Peptide Identification from Shotgun Proteomics Datasets. *Nat. Methods* **2007**, *4* (11), 923–925. <https://doi.org/10.1038/nmeth1113>.
- (53) Käll, L.; Storey, J. D.; Noble, W. S. Quality: Non-Parametric Estimation of q-Values and Posterior Error Probabilities. *Bioinformatics* **2009**, *25* (7), 964–966. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp021>.
- (54) Ashburner, M.; Ball, C. A.; Blake, J. A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J. M.; Davis, A. P.; Dolinski, K.; Dwight, S. S.; Eppig, J. T.; et al. Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* **2000**, *25* (1), 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>.
- (55) The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology Resource: 20 Years and Still GOing Strong. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (D1), D330–D338. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1055>.
- (56) El-Gebali, S.; Mistry, J.; Bateman, A.; Eddy, S. R.; Luciani, A.; Potter, S. C.; Qureshi, M.; Richardson, L. J.; Salazar, G. A.; Smart, A.; et al. The Pfam Protein Families Database in 2019. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (D1), D427–D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>.
- (57) Kanehisa, M.; Goto, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
- (58) Kanehisa, M.; Sato, Y. KEGG Mapper for Inferring Cellular Functions from Protein Sequences. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2019**. <https://doi.org/10.1002/pro.3711>.
- (59) Basenko, E. Y.; Pulman, J. A.; Shanmugasundram, A.; Harb, O. S.; Crouch, K.; Starns, D.; Warrenfeltz, S.; Aurrecochea, C.; Stoeckert, C. J.; Kissinger, J. C.; et al. FungiDB: An Integrated Bioinformatic Resource for Fungi and Oomycetes. *J. Fungi* **2018**, *4* (1), 39. <https://doi.org/10.3390/jof4010039>.
- (60) Estabrook, R. W. Studies of Oxidative Phosphorylation with Potassium Ferricyanide as Electron Acceptor. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236* (11), 3051–3057.
- (61) Terras, F. R.; Schoofs, H. M.; Bolle, M. F. D.; Leuven, F. V.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J.; Cammue, B. P.; Broekaert, W. F. Analysis of Two Novel Classes of Plant Antifungal Proteins from Radish (*Raphanus Sativus* L.) Seeds. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (22), 15301–15309.
- (62) Nanni, V.; Schumacher, J.; Giacomelli, L.; Brazzale, D.; Sbolci, L.; Moser, C.; Tudzynski, P.; Baraldi, E. VvAMP2, a Grapevine Flower-Specific Defensin Capable of Inhibiting Botrytis Cinerea Growth: Insights into Its Mode of Action. *Plant Pathol.* **2014**, *63* (4), 899–910. <https://doi.org/10.1111/ppa.12170>.
- (63) Thevissen, K.; Terras, F. R. G.; Broekaert, W. F. Permeabilization of Fungal Membranes by Plant Defensins Inhibits Fungal Growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65* (12), 5451–5458.
- (64) Wilmes, M.; A. Cammue, B. P.; Sahl, H.-G.; Thevissen, K. Antibiotic Activities of Host Defense Peptides : More to It than Lipid Bilayer Perturbation. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28* (8), 1350–1358. <https://doi.org/10.1039/C1NP00022E>.

- (65) Yeaman, M. R.; Büttner, S.; Thevissen, K. Regulated Cell Death as a Therapeutic Target for Novel Antifungal Peptides and Biologics. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/5473817>.
- (66) Osborn, R. W.; Samblanx, G. W. D.; Thevissen, K.; Goderis, I.; Torrekens, S.; Leuven, F. V.; Attenborough, S.; Rees, S. B.; Broekaert, W. F. Isolation and Characterisation of Plant Defensins from Seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett.* **1995**, *368* (2), 257–262. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00666-W](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00666-W).
- (67) Broekaert, W. F.; Terras, F.; Cammue, B.; Osborn, R. W. Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System. *Plant Physiol.* **1995**, *108* (4), 1353–1358. <https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1353>.
- (68) Spelbrink, R. G.; Dilmac, N.; Allen, A.; Smith, T. J.; Shah, D. M.; Hockerman, G. H. Differential Antifungal and Calcium Channel-Blocking Activity among Structurally Related Plant Defensins. *Plant Physiol.* **2004**, *135* (4), 2055–2067. <https://doi.org/10.1104/pp.104.040873>.
- (69) Schulthess, B.; Ledermann, R.; Mouttet, F.; Zbinden, A.; Bloemberg, G. V.; Böttger, E. C.; Hombach, M. Use of the Bruker MALDI Biotyper for Identification of Molds in the Clinical Mycology Laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52* (8), 2797–2803. <https://doi.org/10.1128/JCM.00049-14>.
- (70) Heberle, H.; Meirelles, G. V.; da Silva, F. R.; Telles, G. P.; Minghim, R. InteractiVenn: A Web-Based Tool for the Analysis of Sets through Venn Diagrams. *BMC Bioinformatics* **2015**, *16* (1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>.
- (71) McColl, A. I.; Bleackley, M. R.; Anderson, M. A.; Lowe, R. G. T. Resistance to the Plant Defensin NaD1 Features Modifications to the Cell Wall and Osmo-Regulation Pathways of Yeast. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01648>.
- (72) Funato, K.; Riezman, H. Vesicular and Nonvesicular Transport of Ceramide from ER to the Golgi Apparatus in Yeast. *J. Cell Biol.* **2001**, *155* (6), 949–960. <https://doi.org/10.1083/jcb.200105033>.
- (73) Hayes, B. M. E.; Bleackley, M. R.; Anderson, M. A.; Van der Weerden, N. L. The Plant Defensin NaD1 Enters the Cytoplasm of *Candida Albicans* via Endocytosis. *J. Fungi* **2018**, *4* (1), 20. <https://doi.org/10.3390/jof4010020>.
- (74) Aerts, A. M.; Bammens, L.; Govaert, G.; Carmona-Gutierrez, D.; Madeo, F.; Cammue, B. P. A.; Thevissen, K. The Antifungal Plant Defensin HsAFP1 from *Heuchera Sanguinea* Induces Apoptosis in *Candida Albicans*. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00047>.
- (75) Bleackley, M. R.; Wiltshire, J. L.; Perrine-Walker, F.; Vasa, S.; Burns, R. L.; van der Weerden, N. L.; Anderson, M. A. Agp2p, the Plasma Membrane Transregulator of Polyamine Uptake, Regulates the Antifungal Activities of the Plant Defensin NaD1 and Other Cationic Peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58* (5), 2688–2698. <https://doi.org/10.1128/AAC.02087-13>.

For Table of Contents



Supporting Information

Impact of an antifungal insect defensin on the proteome of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*

Thomas Aumer¹, Sébastien N. Voisin², Thomas Knobloch³, Céline Landon⁴, Philippe Bulet^{1,2*}

¹ CR Université Grenoble Alpes, Institute for Advanced Biosciences, Inserm U1209, CNRS UMR 5309, Grenoble, France

² Plateforme BioPark d'Archamps, Archamps Technopole, Saint Julien en Genevois, France

³ Bayer SAS, Bayer CropScience, Centre de Recherche de la Dargoire, Lyon, France

⁴ Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, Orléans, France

* Corresponding Author

Dr Philippe Bulet

Plateforme BioPark d'Archamps, Bât. Le Forum 1, 260 Avenue Marie Curie, Archamps Technopole, Saint Julien en Genevois Cedex, France

E-mail address: philippe.bulet@univ-grenoble-alpes.fr, philippe.bulet@biopark-archamps.org

Material S1: Composition of reaction mix for the activity test on respiratory chain complex

Figure S1: Distribution of MALDI-MS ions in *B. cinerea* mycelium fingerprints

Figure S2: Volcano plots depicting significantly dysregulated *B. cinerea* proteins in the presence of ETD151

Figure S3: Mapping of dysregulated proteins on *B. cinerea* spliceosome pathway

Figure S4: Mapping of dysregulated proteins on *B. cinerea* protein processing pathway

Figure S5: Mapping of dysregulated proteins on *B. cinerea* endocytosis pathway

Figure S6: Mapping of dysregulated proteins on *B. cinerea* MAPK signaling pathway

Figure S7: Mapping of dysregulated proteins on *B. cinerea* oxidative phosphorylation pathway

Table S1: MALDI-MS fingerprinting of *B. cinerea* mycelial extracts (.xlsx)

Table S2: List of KEGG *B. cinerea* pathways with significantly dysregulated proteins (.xlsx)

Material S1: Composition of reaction mix for the activity test on respiratory chain complex

Reaction buffer

Sucrose 0,5 M

EDTA 1 mM

KCl 10 mM

MgCl₂ 5 mM

KH₂PO₄ 10 mM

Mix I

8,8 mL reaction buffer

KCN 2,25 mM

K₃Fe(CN)₆ 2,25 mM

ATP 0,75 mM

ADP 0,75 mM

TTP 0,75 mM

NAD 0,45 mM

Acétyl-CoA 0,045 mM

Mix II

8,8 mL reaction buffer

KCN 2,25 mM

K₃Fe(CN)₆ 2,25 mM

ATP 0,75 mM

Figure S1: Distribution of MALDI-MS ions in *B. cinerea* mycelium fingerprints

Distribution of the representative peak list of 100 ions (%) within the 1,500 – 16,000 mass (m/z) range, and according to the concentration of ETD151.

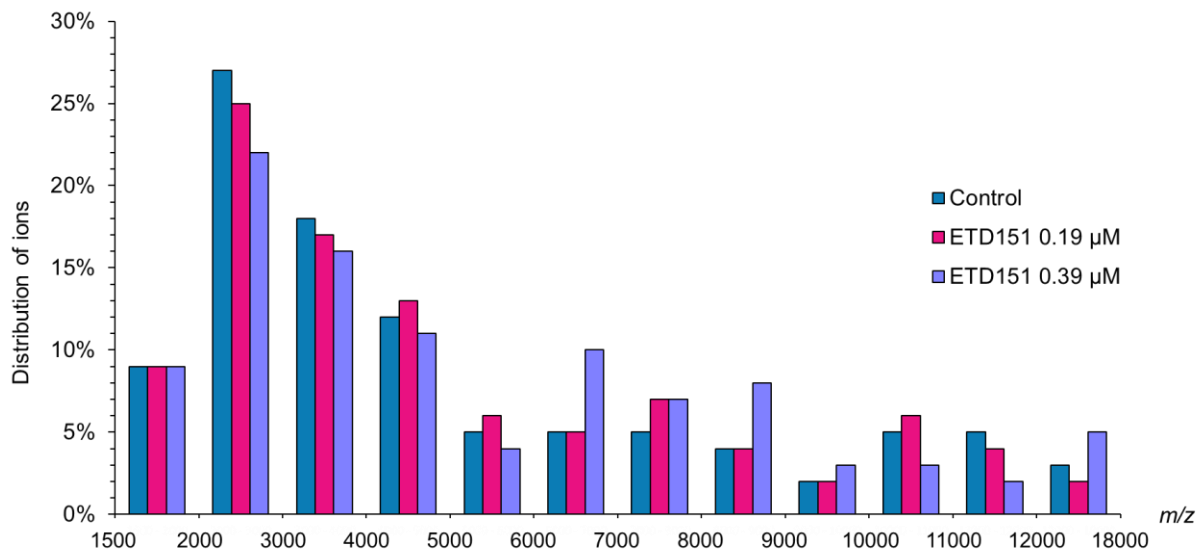


Figure S2: Volcano plots depicting significantly dysregulated *B. cinerea* proteins in the presence of ETD151

In each case, as a concentration of ETD151 compared to Control, differentially abundant proteins are shown following the estimated fold changes (x-axis as \log_2 ratio treated/control) against the $-\log_{10}$ P-value (y-axis). Significantly down-regulating (green) and up-regulating proteins (red) are retained with 95% confidence (P-value ≤ 0.05) and a ± 2 -fold change.

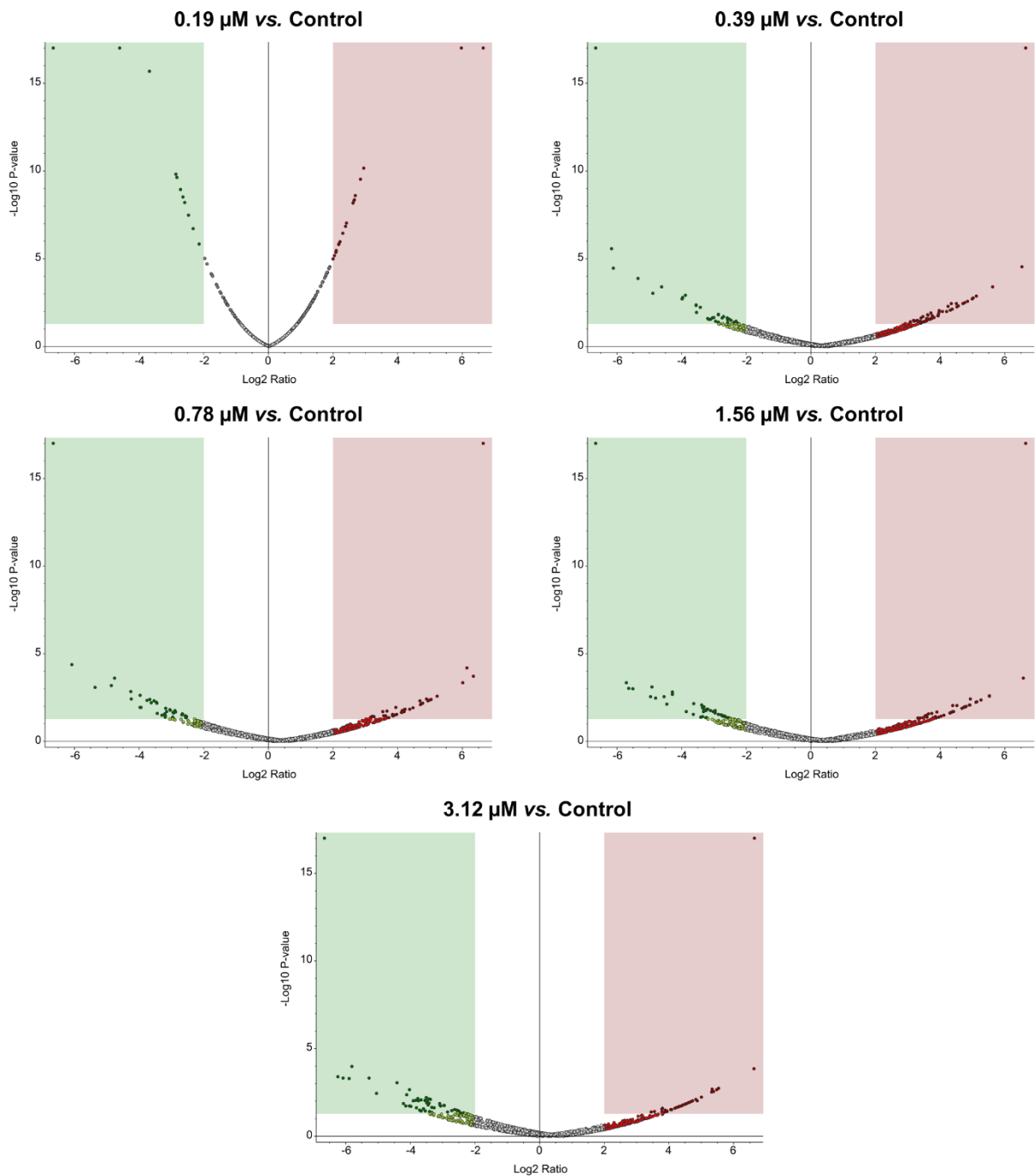
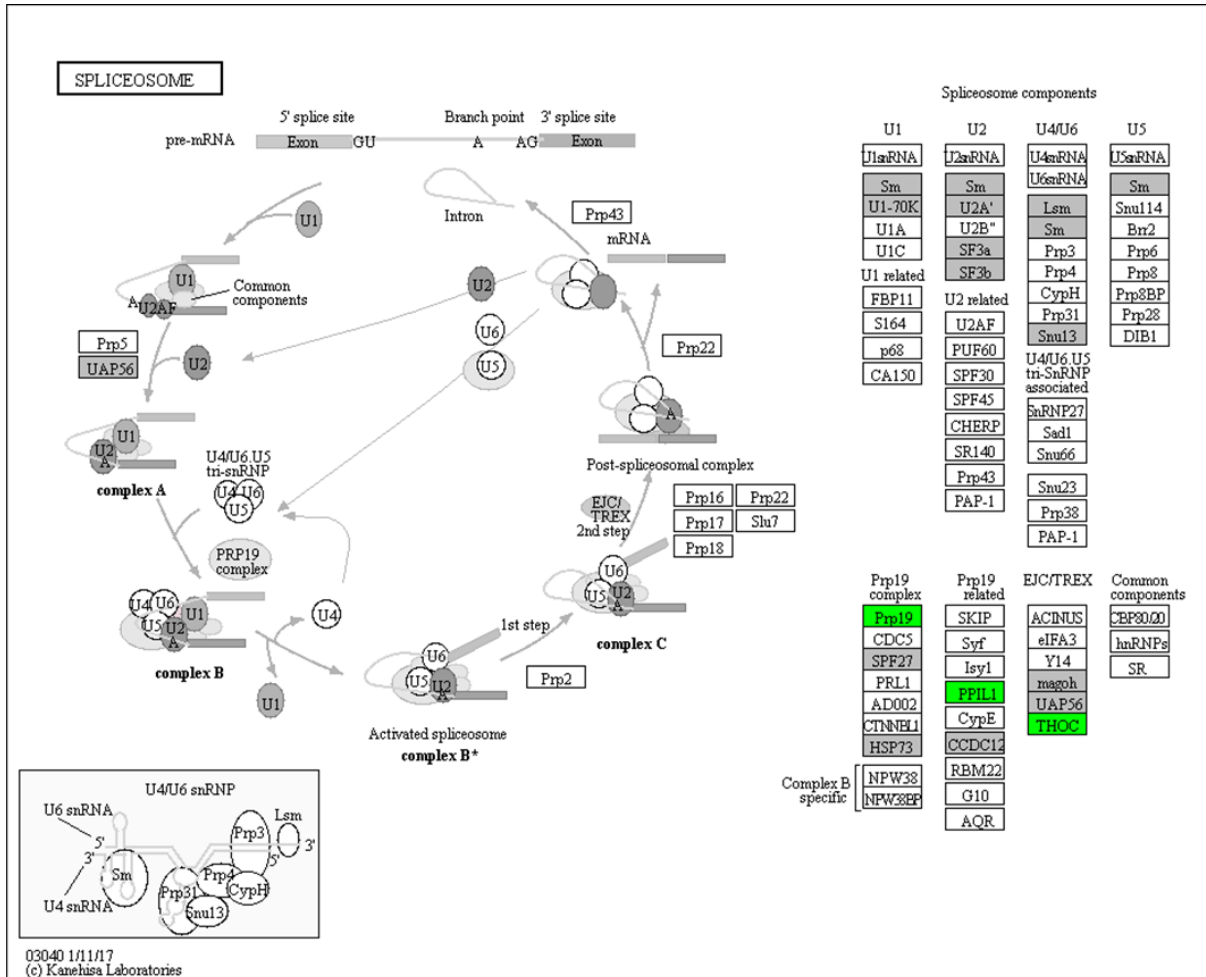


Figure S3: Mapping of dysregulated proteins on *B. cinerea* spliceosome pathway

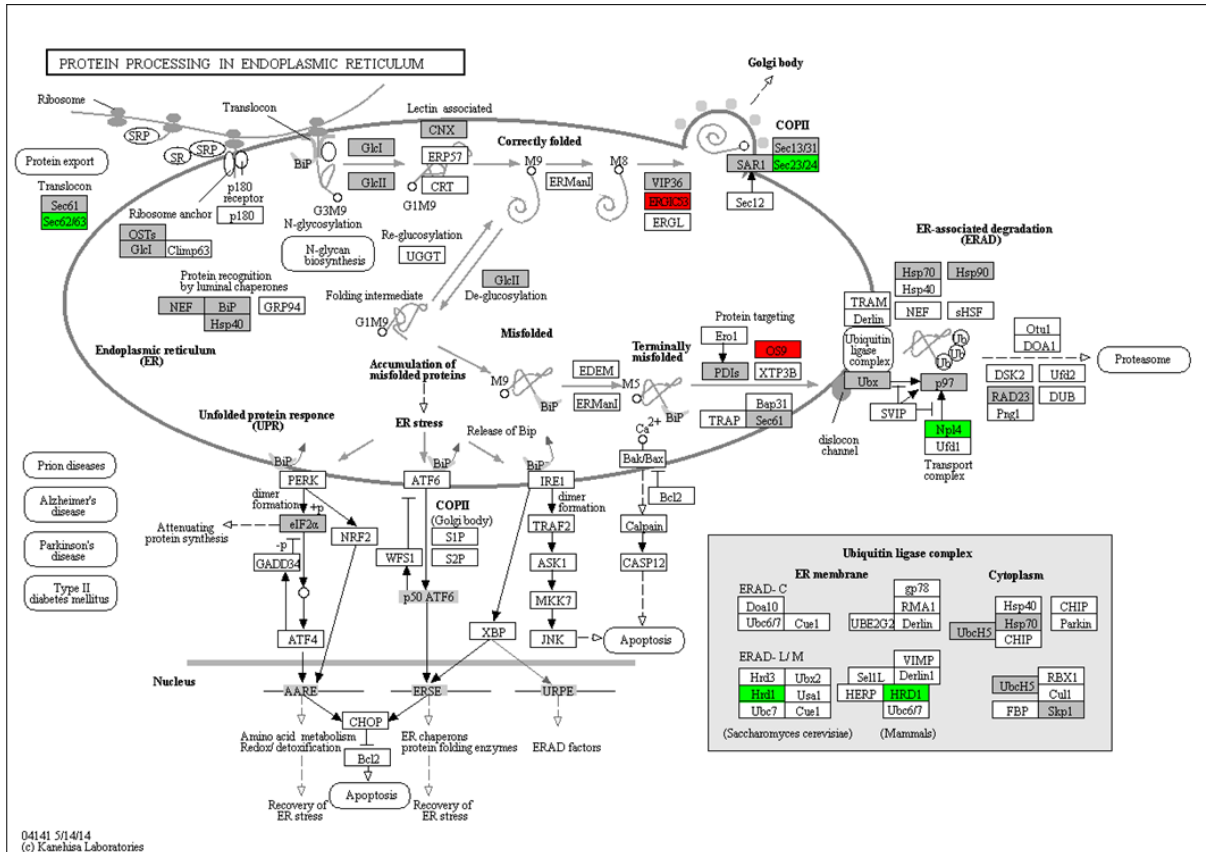
In presence of different concentrations of ETD151 (0.19, 0.39, 0.78, 1.56 and 3.12 μ M), 7 significantly dysregulated proteins (down – green, up – red) were identified from *B. cinerea* mycelial extracts and mapped on the spliceosome pathway (bfu03040).



Protein	Description	Abundance Ratio (log2) [ETD151]/Control:					Abundance Ratio P-Value [ETD151]/Control:				
		0.19	0.39	0.78	1.56	3.12	0.19	0.39	0.78	1.56	3.12
BCIN_08g00660	pre-mRNA-processing factor 19 [EC:2.3.2.27] (Prp19)	-0.09	-1.14	-1.26	-6.64	-6.64	0.79	0.38	0.35	0.00	0.00
BCIN_08g03160	small nuclear ribonucleoprotein D2 (Sm)	-0.37	3.3	3.33	3.5	3.19	0.38	0.03	0.06	0.05	0.11
BCIN_08g06600	small nuclear ribonucleoprotein D3 (Sm)	1.28	3.66	3.24	3.26	3.11	0.01	0.03	0.09	0.11	0.13
BCIN_09g06610	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1 [EC:5.2.1.8] (PPIL1)	-2.46	-3.15	-3.93	-2.86	-1.91	0.00	0.03	0.01	0.10	0.28
BCIN_09g06940	splicing factor 3B subunit 5 (SF3b)	-0.7	-1.19	-2.07	-1.86	-6.64	0.11	0.24	0.09	0.12	0.00
BCIN_09g07050	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7 (Lsm)	1.41	3.09	3.03	3.55	3.41	0.00	0.06	0.06	0.04	0.07
BCIN_13g05240	THO complex subunit 4 (THOC)	-0.21	-1.71	-2.09	-1.85	-2.34	0.61	0.12	0.08	0.12	0.05

Figure S4: Mapping of dysregulated proteins on *B. cinerea* protein processing pathway

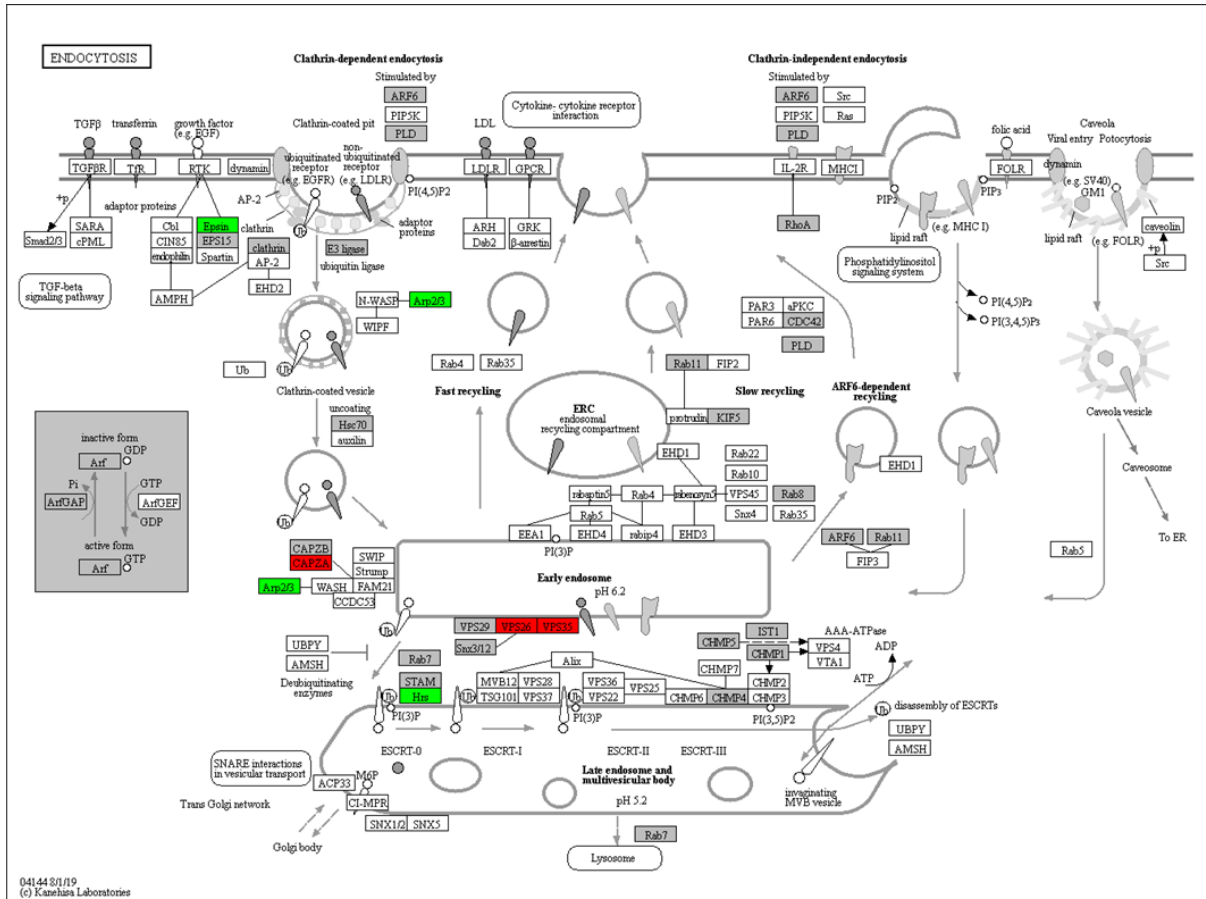
In presence of different concentrations of ETD151 (0.19, 0.39, 0.78, 1.56 and 3.12 μ M), 7 significantly dysregulated proteins (down – green, up – red) were identified from *B. cinerea* mycelial extracts and mapped on the protein processing pathway (bfu04141).



Protein	Description	Abundance Ratio (log2) [ETD151]/Control:					Abundance Ratio P-Value [ETD151]/Control:				
		0.19	0.39	0.78	1.56	3.12	0.19	0.39	0.78	1.56	3.12
BCIN_01g05490	nuclear protein localization protein 4 homolog (Npl4)	-0.58	-6.64	-1.95	-1.43	-6.64	0.18	0.00	0.15	0.33	0.00
BCIN_02g01070	mannosyl-oligosaccharide alpha-1,3-glucosidase [EC:3.2.1.207] (GlcII)	6.64	6.64	6.64	6.64	6.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
BCIN_02g05070	protein transport protein SEC24 (Sec23/24)	-0.46	-3.53	-2.26	-4.80	-6.64	0.28	0.01	0.07	0.00	0.00
BCIN_05g05180	protein OS-9 (OS9)			6.64	6.64				0.00	0.00	
BCIN_07g01430	translocation protein SEC62 (Sec62/63)	-0.47	-2.56	-3.66	-2.25	-3.25	0.27	0.03	0.00	0.06	0.02
BCIN_10g00510	E3 ubiquitin-protein ligase synoviolin [EC:2.3.2.27] (Hrd1)	-0.82	-2.57	-3.19	-2.91	-3.12	0.06	0.07	0.04	0.08	0.08
BCIN_13g00700	lectin, mannose-binding 1 (ERGIC53)		6.64	6.64	6.64	6.64		0.00	0.00	0.00	0.00

Figure S5: Mapping of dysregulated proteins on *B. cinerea* endocytosis pathway

In presence of different concentrations of ETD151 (0.19, 0.39, 0.78, 1.56 and 3.12 μ M), 7 significantly dysregulated proteins (down – green, up – red) were identified from *B. cinerea* mycelial extracts and mapped on the endocytosis pathway (bfu04144).



Protein	Description	Abundance Ratio (log2) [ETD151]/Control:					Abundance Ratio P-Value [ETD151]/Control:				
		0.19	0.39	0.78	1.56	3.12	0.19	0.39	0.78	1.56	3.12
BCIN_01g06150	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A/1B (Arp2/3)	-6.64	2.35	2.57	2.71	3.05	0.00	0.16	0.17	0.16	0.14
BCIN_03g04970	epsin	-0.24	-3.00	-2.96	-2.72	-2.70	0.55	0.02	0.05	0.07	0.09
BCIN_11g01640	vacuolar protein sorting-associated protein 26 (VPS26)		6.64	6.64	6.64	6.64	0.00	0.00	0.00	0.00	
BCIN_11g01920	vacuolar protein sorting-associated protein 35 (VPS35)		6.64	6.64	6.64	6.64	0.00	0.00	0.00	0.00	
BCIN_13g00990	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (Hrs)	-0.42	-1.54	-6.64	-6.64	-1.40	0.33	0.27	0.00	0.00	0.44
BCIN_13g04030	stromal membrane-associated protein (ArfGAP)	-0.11	-6.64	-3.66	-4.27	-3.44	0.76	0.00	0.00	0.00	0.02
BCIN_13g05610	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha (CAPZA)	2.31	3.77	3.47	3.70	3.80	0.00	0.02	0.05	0.06	0.05

CHAPITRE II.

Étude de l'interaction entre le peptide ETD151 et les glucosylcéramides du champignon *B. cinerea*

Introduction

Les investigations concernant le mécanisme d'action du peptide antifongique ETD151 intègrent également l'identification et la caractérisation du ou des partenaire(s) moléculaire(s) ciblé(s) chez le champignon *Botrytis cinerea*. Les travaux réalisés sur la défense antifongique d'insecte héliomicine ont mis en évidence une interaction directe et sélective avec les glucosylcéramides du soja et de la levure *Pichia pastoris* (Thevissen *et al.*, 2004). Cette famille de lipides membranaires, dérivée des sphingolipides, est conservée notamment chez les champignons et les plantes (voir Introduction, p. 45). Tenant compte de la forte similarité en acides aminés entre l'héliomicine et le peptide ETD151 (trois modifications Asp17Asn, Asn19Arg et Gly20Ala) (Landon *et al.*, 2004), nous avons émis l'hypothèse que ce dernier interagirait également avec des glucosylcéramides. Cette proposition est appuyée par une spécificité dans le spectre d'activité de ces deux peptides antifongiques. En effet, l'héliomicine et le peptide ETD151 sont inactifs contre les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida glabrata* (Lamberty *et al.*, 1999 ; Landon *et al.*, 2004), deux espèces naturellement dépourvues de glucosylcéramides (Saito *et al.*, 2006). De plus, la délétion du gène *GCS* codant pour l'enzyme céramide glucosyltransférase (Leipelt *et al.*, 2001) confère une résistance aux défensines antifongiques ciblant les glucosylcéramides chez *Pichia pastoris*, *Candida albicans* et *Fusarium graminearum* (Thevissen *et al.*, 2004 ; Ramamoorthy *et al.*, 2007a ; de Medeiros *et al.*, 2014). Ce phénomène de résistance a également été observé pour un mutant Δgcs du champignon filamenteux *Aspergillus oryzae* face au peptide ETD151 (brevet US20120196324A1, 2012).

De nombreuses structures de glucosylcéramides sont aujourd'hui proposées dans la littérature, sur la base des lipides isolés indifféremment chez des levures ou des champignons filamenteux (Warnecke & Heinz, 2003 ; Barreto-Bergter *et al.*, 2011 ; Calixto *et al.*, 2016). La composition membranaire précise du champignon *B. cinerea* reste cependant méconnue et la présence de glucosylcéramides n'a pour l'instant jamais été confirmée chez ce champignon phytopathogène.

Dans le cadre de cette thèse, une étude sur des mutants Δgcs de levures a été réalisée dans un premier temps pour confirmer le rôle des glucosylcéramides dans le mécanisme d'action du peptide ETD151. D'autre part, une approche sphingolipidomique a été mise en place pour identifier et caractériser ces composés lipidiques membranaires chez *B. cinerea*. Les données obtenues permettront d'interpréter la sensibilité du champignon au peptide ETD151.

Enfin, à l'image des travaux sur la défensine Psd1 du pois (*Pisum sativum*) (de Medeiros *et al.*, 2010), des études d'interaction par résonance magnétique nucléaire (RMN) seront engagées afin d'identifier la région du peptide ETD151 se liant aux lipides. Ces expériences ont nécessité en amont la production du peptide marqué à l'azote 15.

Résultats et Discussions

II.1. Criblage du peptide ETD151 sur des mutants Δgcs de levures

L'hypothèse d'une interaction du peptide ETD151 avec des glucosylcéramides (GlcCer) est basée sur les données extraites de la littérature et sur les résultats obtenus pour l'homologue héliomicine. Ce point a été vérifié lors d'une collaboration établie avec les équipes du Dr Karin Thevissen et du Pr Bruno Cammue du « Centre of Microbial and Plant Genetics » (Leuven, Belgique). Le peptide a été criblé sur des mutants Δgcs des levures *C. albicans* et *P. pastoris* (Leipelt *et al.*, 2001), à l'image des travaux sur l'héliomicine réalisés auparavant dans ce laboratoire (Thevissen *et al.*, 2004). Les données ont été générées en comparaison avec la défensine antifongique RsAFP2 du radis (*Raphanus sativus*), peptide de référence du laboratoire partenaire (Figure 21).

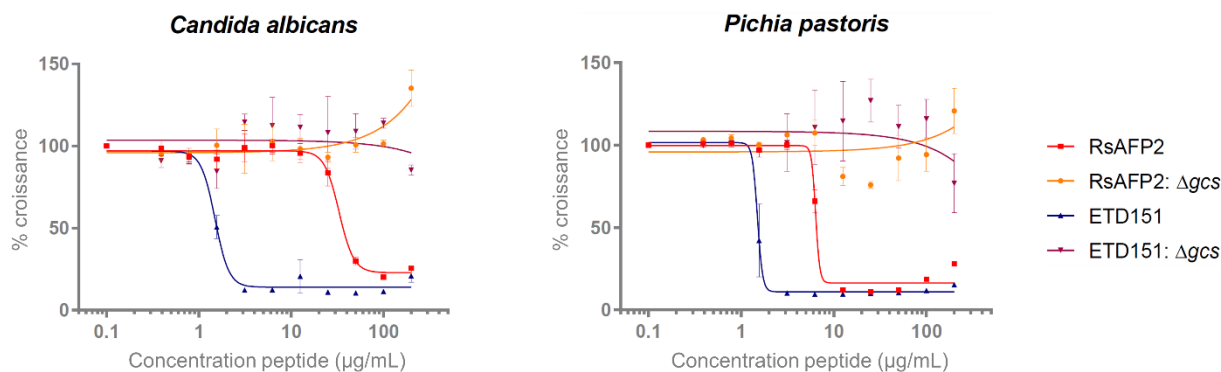


Figure 21. Activité antifongique des défensines RsAFP2 et ETD151 sur des mutants Δgcs de levures

Courbes dose-réponse illustrant la croissance des levures *C. albicans* (CAI4), *P. pastoris* (GS115) et leurs mutants Δgcs en présence de RsAFP2 et ETD151. L'activité des peptides est exprimée en % de croissance par rapport à leurs concentrations en $\mu\text{g/mL}$ (échelle log). L'étude a été réalisée en triplicata et est représentée sous la forme d'une moyenne \pm écart-type.

Le peptide ETD151 s'est avéré particulièrement actif sur les levures *C. albicans* et *P. pastoris*, affichant une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 3,12 $\mu\text{g/mL}$ pour ces deux espèces. Ces données ont confirmé son efficacité accrue en comparaison de l'héliomicine et de RsAFP2 dans les mêmes conditions d'essai (Thevissen *et al.*, 2004) (Tableau 7). L'utilisation de mutants Δgcs , entièrement dépourvus de glucosylcéramides, a totalement réduit l'activité des peptides ETD151 et RsAFP2 avec une CMI $> 200 \mu\text{g/mL}$. Pour autant, la présence du gène *GCS* et de glucosylcéramides chez une espèce fongique ne lui confère pas automatiquement une sensibilité aux défensines antifongiques. En effet, l'activité des défensines DmAMP1 du dahlia (*Dahlia merckii*) et MtDef4 de la luzerne (*Medicago truncatula*) est maintenue face à des mutants Δgcs respectivement de levures et du champignon *F. graminearum* (Tableau 7).

Tableau 7. Activité des défensines de plantes et d'insectes sur plusieurs espèces fongiques et leurs mutants Δgcs

Synthèse des résultats présentés dans la littérature et obtenus lors du criblage du peptide ETD151. Les données sont rapportées sous la forme de concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) ou minimale (CMI ou CI_{100}), exprimées en micromolaire (μM).

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. pastoris</i> (GS115)		<i>C. albicans</i> (CAI4)		<i>F. graminearum</i> (PH-1)		Partenaires membranaires	Références
	WT	WT	Δgcs	WT	Δgcs	WT	$\Delta Fggcs1$		
DmAMP1	0,32 ^a	1,25 ^b	1,25 ^b	5 ^a	5 ^a	nd	nd	M(IP) ₂ C, ergostérol	Thevissen <i>et al.</i> , 2004
MtDef4	nd	nd	nd	nd	nd	0,75 – 1,5 ^c	0,75 – 1 ^c	PA	Ramamoorthy <i>et al.</i> , 2007a, 2007b
MsDef1	nd	nd	nd	nd	nd	1,5 – 3 ^c	6 – 9 ^c	GlcCer, PI(3,5)P ₂	Ramamoorthy <i>et al.</i> , 2007a, 2007b
Psd1	> 19 ^d	nd	nd	9 ^e	15 ^e	nd	nd	GlcCer, ergostérol	Almeida <i>et al.</i> , 2000 ; de Medeiros <i>et al.</i> , 2014
RsAFP2	> 40 ^a	2,0 ^b	> 40 ^b	2,5 ^a	> 40 ^a	0,25 – 0,4 ^c	0,6 – 0,7 ^c	GlcCer	Thevissen <i>et al.</i> , 2004 ; Ramamoorthy <i>et al.</i> , 2007a
Héliomicine	> 40 ^a	2,5 ^a	> 40 ^a	2,5 ^a	> 20 ^a	nd	nd	GlcCer	Thevissen <i>et al.</i> , 2004
ETD151	> 6,3 ^f	0,65 ^a	> 40 ^a	0,65 ^a	> 40 ^a	nd	nd	GlcCer ?	Travaux de thèse

nd : non déterminé, WT : souche sauvage (Wild Type), M(IP)₂C : mannosyl-diinositol-phosphocéramide, PA : acide phosphatidique, PI(3,5)P₂ : phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate

^a CMI en milieu PDB (Potato Dextrose Broth)

^d CI_{50} en milieu PDB

^b CMI en milieu PDB/YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose)

^e CI_{50} en milieu YPD modifié

^c CI_{50} en milieu fongique synthétique sans calcium (Cammue *et al.*, 1992)

^f CI_{50} en milieu YNB complétement en acides aminés

La résistance apparaissant chez les mutants Δgcs de levures et de champignons a démontré le rôle prépondérant des glucosylcéramides dans l'activité de certaines défensines antifongiques dont le peptide ETD151. Par la suite, des études de liaison lipide-peptide ont justifié ces résultats en identifiant des interactions directes des défensines héliomicine, RsAFP2, Psd1 et MsDef1 avec les GlcCer (Thevissen *et al.*, 2004 ; Gonçalves *et al.*, 2012 ; Muñoz *et al.*, 2014). Les données obtenues pour le peptide ETD151 sur des mutants Δgcs de levures suggéreraient donc les glucosylcéramides comme partenaires membranaires. Pour expliquer la sensibilité de *B. cinerea* au peptide ETD151, les travaux ont été orientés sur la découverte et la caractérisation des GlcCer chez ce champignon.

II.2. Identification du gène *GCS* chez le champignon *B. cinerea*

En amont de l'approche sphingolipidomique, la présence du gène *GCS* chez le champignon *B. cinerea* a été vérifiée par une recherche BLAST ou « Basic Local Alignment Search Tool » (Camacho *et al.*, 2009). La séquence protéique associée au gène *GCS* chez le champignon *F. graminearum* (FGSG_05955 ou FGRAMPH1_01G19155, Ma *et al.*, 2010) a été interrogée sur la base de données protéiques déduite du génome du champignon *B. cinerea* (van Kan *et al.*, 2017). La recherche BLAST a établi la meilleure correspondance avec la protéine Bcin02p00640.1, transcrite du gène Bcin02g00640, affichant 46 % d'identité et une E-value de $3e^{-163}$. Cette identification chez *B. cinerea* a été ensuite confirmée par BLAST chez les champignons filamenteux *Magnaporthe grisea*, *Aspergillus nidulans* et *Neurospora crassa* (Tableau 8).

Tableau 8. Identification par BLAST du gène *GCS* chez le champignon *Botrytis cinerea*

Interrogations BLAST+ protéine-protéine (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) selon la matrice BLOSUM62 et les paramètres par défaut. Séquences candidates alignées par rapport aux séquences protéiques du champignon *B. cinerea* B05.10 (ASM83294v1, http://fungi.ensembl.org/Botrytis_cinerea/).

Séquence candidate		Meilleure correspondance chez <i>B. cinerea</i>		
Espèce	Gène <i>GCS</i>	Gène	% identité	% similarité
<i>F. graminearum</i>	FGSG_05955 ^a	Bcin02g00640	46 %	62 %
<i>M. grisea</i>	MGG_10668 ^b	Bcin02g00640	52 %	64 %
<i>N. crassa</i>	NCU01116 ^c	Bcin02g00640	53 %	66 %
<i>A. nidulans</i>	AN8806 ^d	Bcin02g00640	54 %	67 %

^a Ramamoorthy *et al.*, 2007a ; ^b Leipelt *et al.*, 2001 ; ^c Muñoz *et al.*, 2014 ; ^d Fernandes *et al.*, 2016

Bcin02g00640 est le gène codant pour la protéine Bcin02p00640.1. D'après la base de données EnsemblFungi¹ (Kersey *et al.*, 2018), Bcin02g00640 présente 223 orthologues mais aucune information transcriptomique n'est communiquée à son sujet. La protéine Bcin02p00640.1 est annotée avec 7 domaines. La section 136-178 de la séquence en acides aminés correspond notamment au domaine PFAM² PF13506 (El-Gebali *et al.*, 2019) décrivant une famille d'enzymes céramide beta-glucosyltransférase (EC:2.4.1.80). De plus, trois domaines transmembranaires (6 – 27, 412 – 434 et 476 – 496) ont été prédits sur la séquence de la protéine Bcin02p00640.1 à l'aide de l'application Phobius³ (Käll *et al.*, 2007).

L'outil DeepLoc⁴ (Almagro Armenteros *et al.*, 2017) a proposé pour cette protéine une localisation au niveau du réticulum endoplasmique. Ce résultat est cohérent avec les données de la littérature. En effet, la protéine Bcin02p00640.1 serait transférée après sa synthèse vers l'appareil de Golgi décrit comme le site de production des glucosylcéramides (Rodrigues *et al.*, 2000 ; Barreto-Bergter *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces éléments a démontré que le gène *GCS* codant pour l'enzyme céramide glucosyltransférase est conservé chez le champignon *B. cinerea*. Notre hypothèse de travail a pris forme et nous avons poursuivi nos travaux par l'isolation et la caractérisation des glucosylcéramides à partir d'extraits lipidiques membranaires de *B. cinerea*.

¹ <https://fungi.ensembl.org/>

² <http://pfam.xfam.org/>

³ <http://phobius.sbc.su.se/>

⁴ <http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/>

II.3. Recherche de glucosylcéramides chez *B. cinerea*

L'extraction des lipides membranaires est une étape cruciale afin de garantir une analyse performante des sphingolipides présents. Parmi les nombreuses méthodes proposées dans la littérature (Merrill *et al.*, 2005 ; Barreto-Bergter *et al.*, 2011), le protocole mis en avant par Singh & Del Poeta (2016) a été adapté pour l'extraction des sphingolipides chez *B. cinerea*. Sur la base de leur mobilité en chromatographie sur couche mince (CCM), les glucosylcéramides du champignon ont été identifiés par comparaison avec plusieurs standards commerciaux (Avanti Polar Lipids) : C₁₇ Sphingosine, C₁₇ Céramide, C₁₇ GlcCer, C₁₈ GlcCer, C_{18:1} GlcCer et GlcCer de soja (Figure 22) (voir Matériels et Méthodes, p. 72).

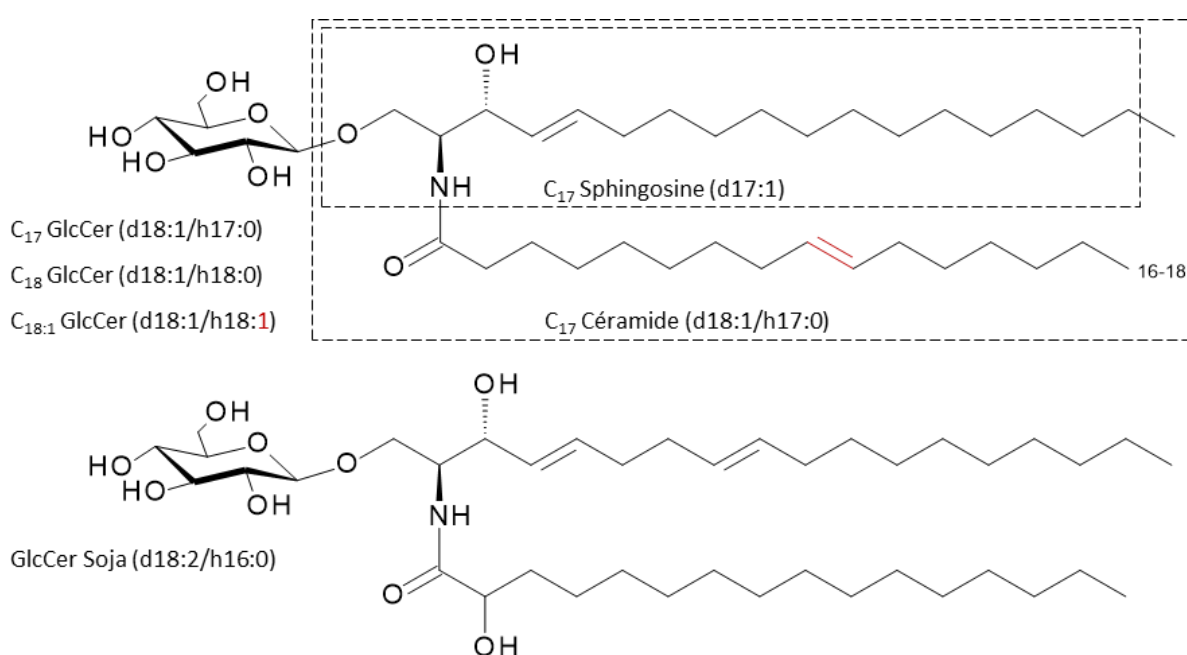


Figure 22. Structures des standards lipidiques sélectionnés pour l'identification des glucosylcéramides de *B. cinerea*
 Représentations superposées de la C₁₇ Sphingosine (cadre), du C₁₇ Céramide (cadre), des C₁₇ GlcCer, C₁₈ GlcCer et C_{18:1} GlcCer (insaturation en rouge) ; du GlcCer de soja. Par convention, la base sphingoïde et l'acide gras sont désignés respectivement par les lettres d et h ; le premier numéro correspondant au nombre de carbones et le second au nombre d'insaturations. Ces standards sont entièrement synthétiques à l'exception du GlcCer de soja extrait naturellement (Sullards *et al.*, 2000).

Dans nos conditions expérimentales, les extraits lipidiques de *B. cinerea* séparés sur CCM (Figure 23) ont présenté une bande située à la hauteur de migration H_c et dont l'intensité a augmenté proportionnellement avec la quantité d'échantillon déposée (flèches, puits 5 à 8). La bande H_c est également apparue pour le GlcCer de soja (puits 3), au contraire des autres standards GlcCer (d18:1/h17:0, d18:1/h18:0 et d18:1/h18:1) migrant à la hauteur H_b (puits 1, 2 et 9). Cette différence de mobilité entre les bandes H_b et H_c pourrait s'expliquer par la présence d'un groupe hydroxyle sur la chaîne acide gras. Ce dernier accentuerait la polarité des GlcCer de *B. cinerea* et du soja et justifierait une affinité plus importante avec la silice,

phase stationnaire polaire. Les variations dans le nombre de carbones ou d'insaturations de la chaîne acide gras parmi les standards GlcCer n'ont pas permis une séparation plus nette de ces lipides. Enfin, deux bandes présentes chez les extraits lipidiques de *B. cinerea* et migrant aux hauteurs H_a et H_d pourraient être assimilées respectivement aux standards Céramide (d18:1/h17:0) et Sphingosine (d17:1) (puits 9 et 10). Ces composés sont similaires à deux intermédiaires décrits dans la voie de biosynthèse des sphingolipides (Merrill, 2011).

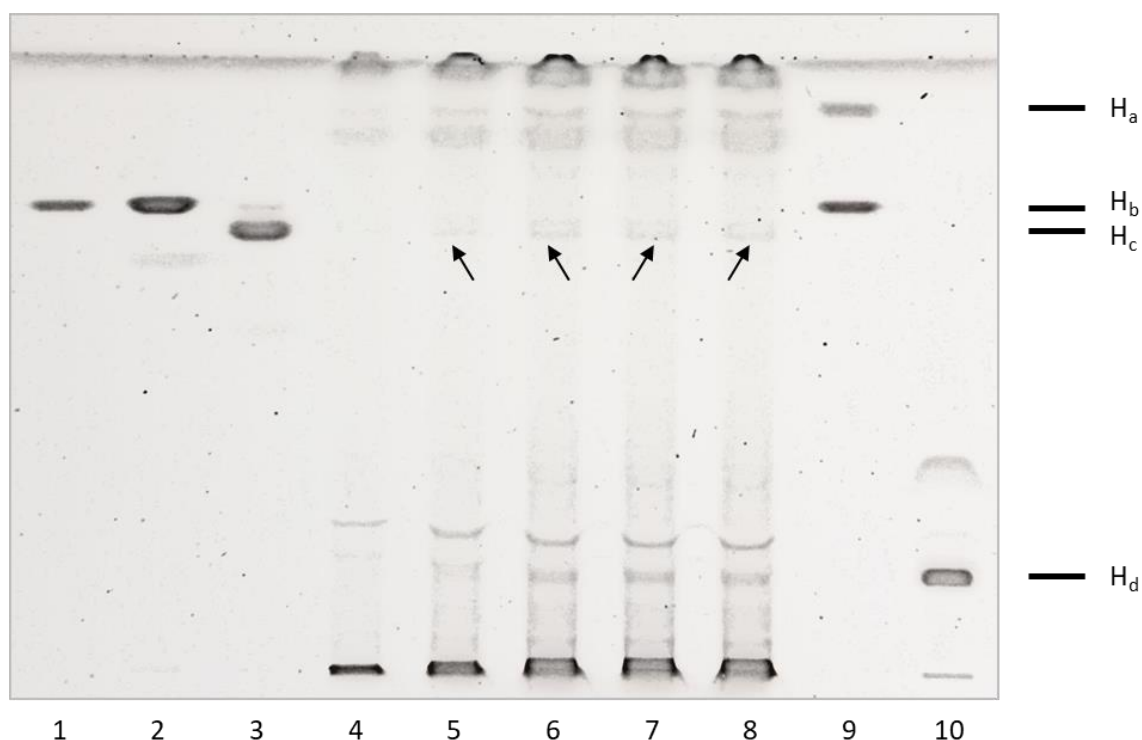


Figure 23. Identification des glucosylcéramides de *B. cinerea* par chromatographie sur couche mince

Les extraits lipidiques membranaires du champignon ont été déposés selon les quantités suivantes : 23, 46, 69, 92 et 115 μg respectivement pour les puits 4 à 8. Les bandes pouvant correspondre à des glucosylcéramides ou à leurs intermédiaires ont été identifiées à l'aide d'une sélection de standards lipidiques commerciaux. La hauteur de migration des bandes a été précisée sur la droite de la plaque CCM. Les standards (5 μg) ont été déposés dans l'ordre suivant : GlcCer (d18:1/h18:0) en 1, GlcCer (d18:1/h18:1) en 2, GlcCer de soja (d18:2/h16:0) en 3, mélange GlcCer (d18:1/h17:0) - Céramide (d18:1/h17:0) en 9 et Sphingosine (d17:1) en 10.

La chromatographie sur couche mince a contribué à l'identification de glucosylcéramides dans les extraits lipidiques de *B. cinerea*. La bande H_c désignerait un lipide de structure comparable au GlcCer de soja, de type hydroxylé. Le champignon *B. cinerea* s'ajouterait ainsi à la liste des nombreuses espèces fongiques conservant les glucosylcéramides (Warnecke & Heinz, 2003). Ce résultat a permis d'envisager la caractérisation structurale des GlcCer de *B. cinerea* en collaboration avec le Dr Alexandra Berlioz-Berhier du Centre Commun de Spectrométrie de Masse (Lyon, France). Une approche par LC-ESI-MS/MS a été adoptée pour étudier d'une part la tête des sphingolipides en mode positif (ion pseudo-moléculaire MH^+) et d'autre part leurs chaînes latérales en mode négatif (ion pseudo-moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$) (Brügger, 2014).

II.4. Validation de l'approche par spectrométrie de masse

L'analyse LC-ESI-MS/MS rend possible l'extraction et l'identification des glucosylcéramides. Ces sphingolipides répondent aux critères suivants : une masse atomique impaire liée à la présence d'un atome d'azote unique (liaison amide) et une perte neutre de 180 Da en MS/MS propre à la tête glycosylée ($C_6H_{12}O_6$). La méthode analytique a été validée par l'injection du GlcCer de soja (d18:2/h16:0), retenu comme standard, et la génération des spectres de masse haute résolution. Le spectre ESI-MS (Figure 24a) a mis en évidence trois adduits $[M-H]^-$, $[M+HCOOH-H]^-$ et $[M+CF_3COOH-H]^-$, respectivement les ions m/z 712, 758 et 826, correspondant à un lipide de formule brute $C_{40}H_{75}NO_9$ (713 Da). L'analyse du spectre ESI-MS/MS de l'ion MH^+ m/z 714 (Figure 24b) a permis d'isoler des pertes de masses caractéristiques facilitant la résolution de la structure du sphingolipide. Sur la base d'une masse de 696 Da (= 714 – 18, correspondant à la perte d'une molécule d'eau), la présence de la tête glycosylée (180 Da) a été confirmée. La perte neutre de 254 Da ($C_{16}H_{30}O_2$) est associée à une chaîne acide gras de 16 carbones, saturée (h16:0) et hydroxylée. L'ensemble de ces données a coïncidé avec le profil du GlcCer de soja (Figure 24c) (Sullards *et al.*, 2000).

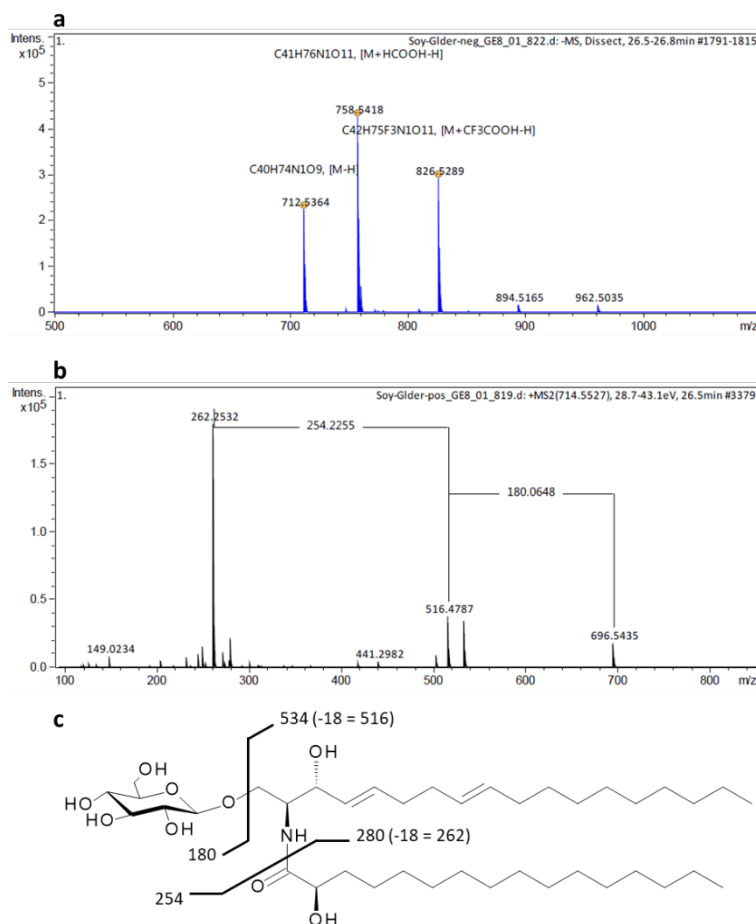


Figure 24. Résolution de la structure du GlcCer de soja par spectrométrie de masse
 Assemblage réalisé à partir (a) du spectre ESI-MS, (b) du spectre ESI-MS/MS de l'ion m/z 714 et (c) de l'attribution et la soustraction des masses à la structure du GlcCer.

L'analyse du spectre ESI-MS/MS de l'ion $[M+HCOOH-H]^-$ m/z 758 (Figure 25) a mis en évidence de nombreux fragments issus de l'ionisation des chaînes latérales du GlcCer de soja. L'association de ces fragments (en bleu, Tableau 9) a facilité la reconstitution de la structure complète du sphingolipide.

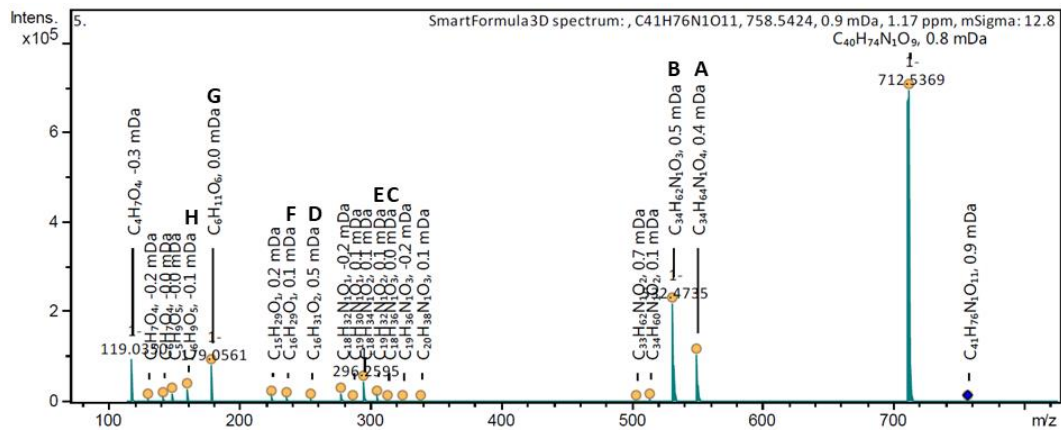


Figure 25. Spectre ESI-MS/MS de l'ion m/z 758 associé au GlcCer de soja
Spectre de masse dont les pics ont été identifiés selon leur rapport m/z et la formule brute associée. Les fragments annotés (A à H) se rapportent au Tableau 10.

Tableau 9. Positionnement des fragments de l'ion m/z 758 sur la structure du GlcCer de soja

Ion $[M-H]^-$	Structure entière – Fragment	Formule	m/z
A		$C_{34}H_{64}NO_4^-$	550,4841
B		$C_{34}H_{62}NO_3^-$	532,4735
C		$C_{18}H_{36}NO_3^-$	314,2701
D		$C_{16}H_{31}O_2^-$	255,2330
E		$C_{19}H_{32}NO_2^-$	306,2439
F		$C_{16}H_{29}O^-$	237,2224
G		$C_6H_{11}O_6^-$	179,0561
H		$C_6H_9O_5^-$	161,0455

II.5. Caractérisation des glucosylcéramides du champignon *B. cinerea*

La méthodologie validée précédemment avec le GlcCer de soja a été employée pour résoudre la structure des GlcCer présents dans des extraits lipidiques membranaires de *B. cinerea*. Trois composés *Bc*-GlcCer-1 à *Bc*-GlcCer-3, éluant respectivement à 21,5 min, 26 min et 27,1 min (Figure 26), ont été isolés après injection des échantillons sur une colonne en phase inverse (voir Matériels et Méthodes, p. 71). Le composé C_{17} GlcCer (d18:1/h17:0), choisi comme étalon interne, a été ajouté dans chaque échantillon avant extraction afin d'évaluer la reproductibilité du protocole adapté de Singh & Del Poeta (2016). L'abondance relative du C_{17} GlcCer est restée stable entre les différents extraits, de l'ordre de $1,5 \times 10^5$ (Figure 26), démontrant une bonne reproductibilité. L'influence de la quantité initiale de mycélium utilisée pour le protocole d'extraction, de 5 à 100 mg en poids sec, a également été évaluée. Les trois glucosylcéramides ont été identifiés pour chacun des cas et leurs abondances relatives dans les extraits lipidiques de *B. cinerea* ont été corrélées avec la quantité de mycélium initiale. Enfin, à l'exception du composé *Bc*-GlcCer-1 pour un poids sec de 50 mg, les chromatogrammes des échantillons soumis à une hydrolyse alcaline n'ont pas traduit d'enrichissement en glucosylcéramides. Il se pourrait que la composition des échantillons soit encore trop complexe pour que cette étape optionnelle soit réellement bénéfique.

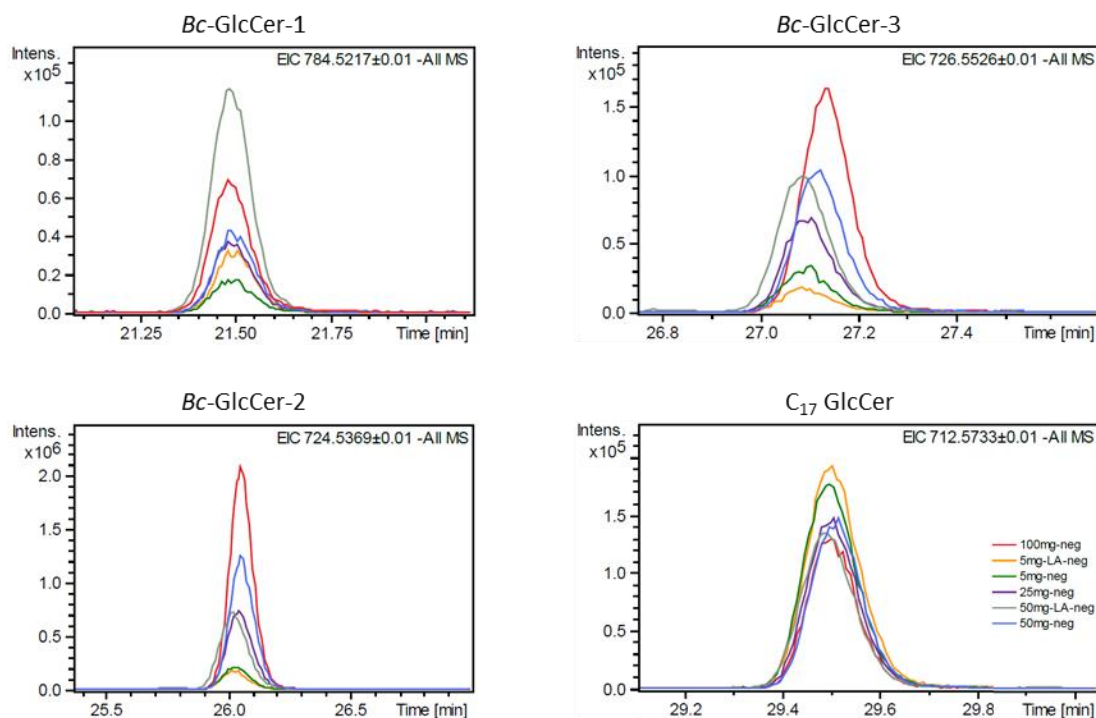


Figure 26. Éluion et abondance relative des glucosylcéramides identifiés chez *B. cinerea*

Les composés *Bc*-GlcCer-1, *Bc*-GlcCer-2 et *Bc*-GlcCer-3 ainsi que le C_{17} GlcCer, étalon interne préalablement ajouté dans les échantillons, ont été identifiés par LC-ESI-MS/MS dans les extraits lipidiques membranaires de *B. cinerea*. L'abondance relative des glucosylcéramides dans chaque échantillon est illustrée par l'intensité des chromatogrammes. Ces derniers sont référencés selon le poids sec en mycélium avant extraction : 5 mg (vert), 5 mg avec hydrolyse alcaline (LA) (orange), 25 mg (violet), 50 mg (bleu), 50 mg (LA) (gris) et 100 mg (rouge).

Le composé *Bc*-GlcCer-1 a présenté en ESI-MS (Figure 27a) deux adduits $[M-H]^-$ et $[M+HCOOH-H]^-$, respectivement les ions m/z 738 et 784, attribués à un sphingolipide de formule brute $C_{41}H_{73}NO_{10}$ (739 Da). Le spectre ESI-MS/MS de l'ion MH^+ m/z 740 (Figure 27b) a confirmé une perte neutre de 180 Da ($C_6H_{12}O_6$) liée à la tête glycosylée. La perte neutre de 252 Da ($C_{16}H_{28}O_2$) a été associée à une chaîne acide gras composée de 16 carbones, mono-insaturée (h16:1) et hydroxylée. Ces résultats ont été associés par déduction à une base sphingoïde de formule brute $C_{19}H_{33}NO_2$. Par conséquent, cette dernière différait de la 9-méthyl-4,8-sphingadiénine ($C_{19}H_{35}NO$), forme décrite dans la voie de biosynthèse des GlcCer de champignons (Poeta *et al.*, 2014). Pour une raison inconnue, il est à noter que le spectre de fragmentation ESI-MS/MS en mode négatif n'a pas pu être généré expérimentalement. En l'absence de ces données, il n'a pas été possible de proposer une structure pour le composé *Bc*-GlcCer-1. De nouveaux extraits lipidiques membranaires de *B. cinerea* devront être analysés pour compléter les éléments précédemment détaillés pour *Bc*-GlcCer-1 et présenter une structure.

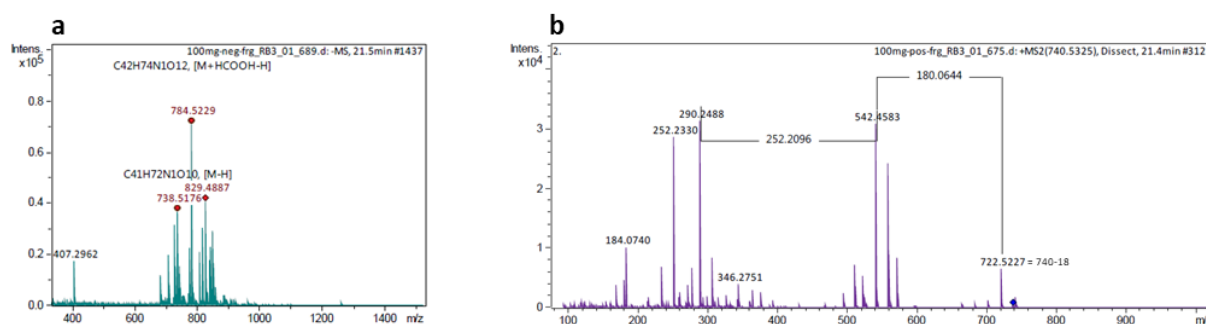


Figure 27. Analyse de la structure du glucosylcéramide *Bc*-GlcCer-1 par spectrométrie de masse
Données comprenant (a) le spectre ESI-MS et (b) le spectre ESI-MS/MS de l'ion m/z 740.

Le composé *Bc*-GlcCer-2 a présenté en ESI-MS (Figure 28a) trois adduits $[M-H]^-$, $[M+HCOOH-H]^-$ et $[M+CF_3COOH-H]^-$, respectivement les ions m/z 724, 770 et 838, attribués à un lipide de formule brute $C_{41}H_{75}NO_9$ (725 Da). Le spectre ESI-MS/MS de l'ion MH^+ m/z 726 (Figure 28b) a confirmé des pertes neutres liées à la tête glycosylée (180 Da, $C_6H_{12}O_6$) et à une chaîne acide gras mono-insaturée (h16:1) et hydroxylée (252 Da, $C_{16}H_{28}O_2$). Par déduction, la base sphingoïde a été identifiée comme une 9-méthyl-4,8-sphingadiénine ($C_{19}H_{35}NO$). Cependant, notre approche par spectrométrie de masse n'a pas fourni le positionnement de l'insaturation sur la chaîne acide gras (h16:1). Parmi les nombreuses structures de glucosylcéramides fongiques détaillées dans la littérature, il est courant de trouver une chaîne acide gras Δ^3 -insaturée. C'est notamment le cas des champignons *M. grisea* (h16:1) (Koga *et al.*, 1998), *Aspergillus fumigatus* (h18:1) (Villas Boas *et al.*, 1994) et *Fusarium solani* (h18:1) (Duarte *et al.*, 1998). À ce stade des travaux, nous avons proposé la structure la plus probable pour le glucosylcéramide *Bc*-GlcCer-2 en intégrant l'insaturation en position Δ^3 (Figure 28c). L'assemblage des fragments issus du spectre ESI-MS/MS de l'ion $[M+HCOOH-H]^-$ m/z 770 (Figure 28d) a permis de valider partiellement la structure de *Bc*-GlcCer-2. Pour confirmer notre hypothèse de structure, le composé *Bc*-GlcCer-2 devra être purifié à partir de nouveaux extraits lipidiques membranaires de *B. cinerea* et analysé en LC-ESI-MS/MS afin de reconstituer la chaîne acide gras, carbone après carbone.

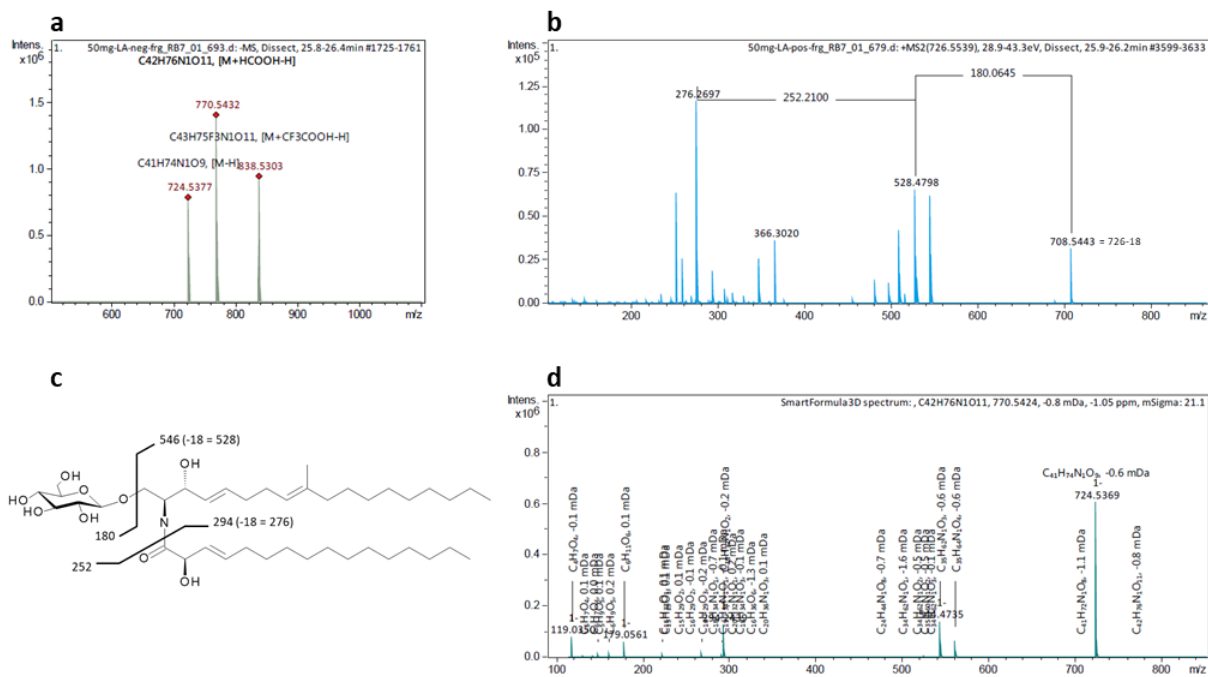


Figure 28. Résolution de la structure du glucosylcéramide *Bc*-GlcCer-2 par spectrométrie de masse

Assemblage réalisé à partir (a) du spectre ESI-MS et des spectres ESI-MS/MS de (b) l'ion m/z 726 et (d) l'ion m/z 770. (c) Les masses et soustractions de masses ont été attribuées à la structure proposée pour ce glucosylcéramide.

Le composé *Bc*-GlcCer-3 a présenté en ESI-MS (Figure 29a) trois adduits $[M-H]^-$, $[M+HCOOH-H]^-$ et $[M+CF_3COOH-H]^-$, respectivement les ions m/z 726, 772 et 840, attribués à un lipide de formule brute $C_{41}H_{77}NO_9$ (727 Da). De plus, le spectre ESI-MS/MS de l'ion MH^+ m/z 728 (Figure 29b) a affiché les mêmes pertes neutres que lors de l'analyse de GlcCer de soja. Ces éléments ont permis de proposer une structure pour le glucosylcéramide *Bc*-GlcCer-3 (Figure 29c) intégrant une tête glycosylée (180 Da, $C_6H_{12}O_6$), une chaîne acide gras saturée (h16:0) (254 Da, $C_{16}H_{30}O_2$) et par déduction une 9-méthyl-4,8-sphingadiénine ($C_{19}H_{35}NO$). Notre proposition a été validée par l'assemblage des fragments issus du spectre ESI-MS/MS de l'ion $[M-H]^-$ m/z 726 (Figure 29d). Cette structure identifiée chez *B. cinerea* a déjà été caractérisée auparavant chez le champignon *Pseudallescheria boydii* (Pinto *et al.*, 2002).

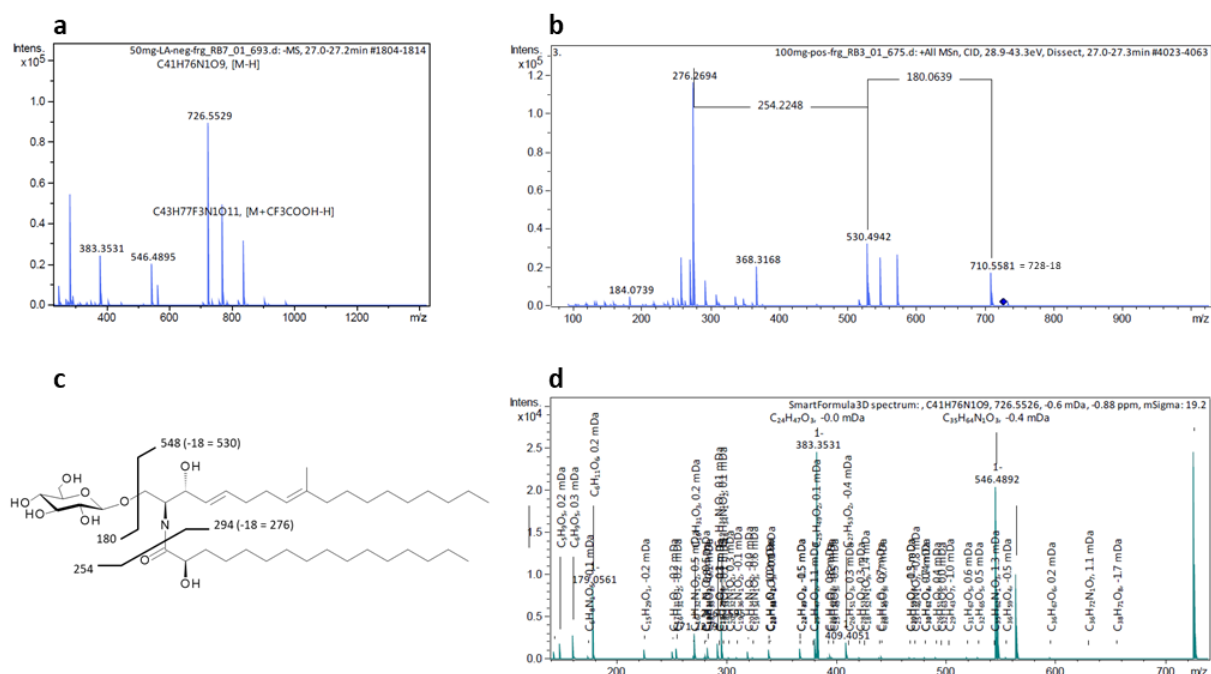


Figure 29. Résolution de la structure du glucosylcéramide *Bc*-GlcCer-3 par spectrométrie de masse

Assemblage réalisé à partir (a) du spectre ESI-MS et des spectres ESI-MS/MS de (b) l'ion m/z 728 et (d) l'ion m/z 726. (c) Les masses et soustractions de masses ont été attribuées à la structure proposée pour ce glucosylcéramide.

En complément de la caractérisation structurale des glucosylcéramides *Bc*-GlcCer-1 à *Bc*-GlcCer-3, une approche par LC-ESI-MS a également permis de distinguer certains précurseurs dans la voie de biosynthèse de ces sphingolipides. La cascade aboutissant au composé *Bc*-GlcCer-3, choisi comme référence pour la suite des travaux, a été reconstituée par identification des intermédiaires dihydrocéramide (dhCer), α -dihydroxycéramide (OH-Cer), α -hydroxy- Δ 8-céramide (OH- Δ 8-Cer) et α -hydroxy- Δ 8,9-céramide (OH- Δ 8,9-Me-Cer) (Rella *et al.*, 2016) dans les extraits lipidiques membranaires de *B. cinerea* (Figure 30).

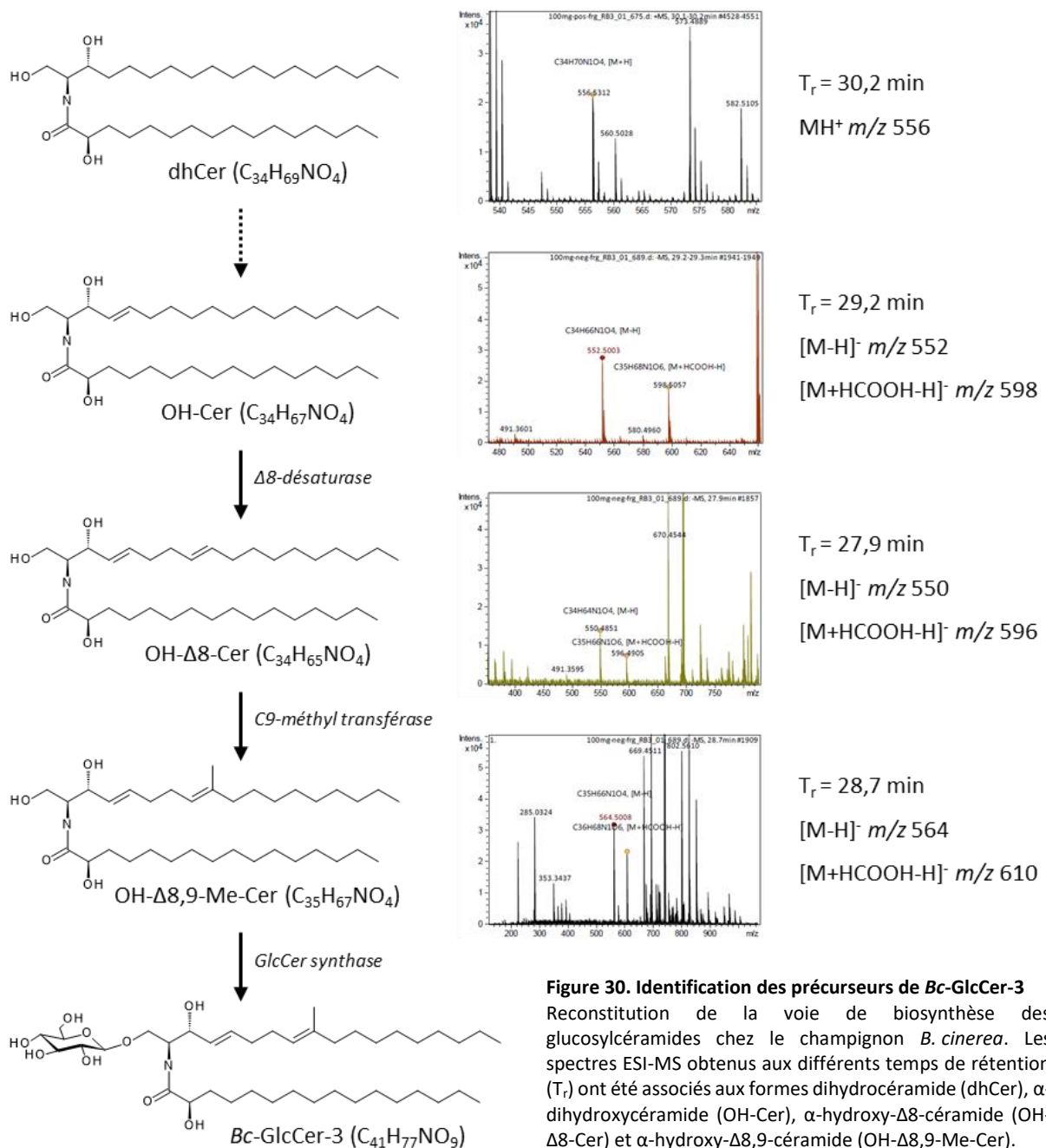


Figure 30. Identification des précurseurs de Bc-GlcCer-3

Reconstitution de la voie de biosynthèse des glucosylcéramides chez le champignon *B. cinerea*. Les spectres ESI-MS obtenus aux différents temps de rétention (T_r) ont été associés aux formes dihydrocéramide (dhCer), α -dihydroxycéramide (OH-Cer), α -hydroxy- $\Delta 8$ -céramide (OH- $\Delta 8$ -Cer) et α -hydroxy- $\Delta 8,9$ -céramide (OH- $\Delta 8,9$ -Me-Cer).

Ces travaux ont constitué la première caractérisation de glucosylcéramides chez le champignon *B. cinerea*. La structure du composé Bc-GlcCer-3 a été déterminée avec assurance mais de nouvelles analyses seront nécessaires pour confirmer les structures de Bc-GlcCer-1 et Bc-GlcCer-2. Ne disposant pas d'une quantité pure de Bc-GlcCer-3 et afin de s'affranchir d'une étape lourde de purification des sphingolipides, nous avons décidé de débiter les études d'interaction par RMN sur un modèle proche : le GlcCer de soja, dont seul le groupe 9-Me est absent. Ce composé était disponible commercialement avec une pureté de 98 % (Avanti Polar Lipids). La réalisation de ces expériences a nécessité de disposer d'une quantité suffisante du peptide ETD151 marqué isotopiquement à l'azote 15. Dans ce but, l'expression du peptide par une approche recombinante a été mise en place chez la levure *S. cerevisiae*.

II.6. Validation de la souche recombinante W303 α (pDEF151) de *S. cerevisiae*

La bactérie *Escherichia coli* et la levure *P. pastoris* sont deux modèles couramment employés pour l'expression hétérologue de protéines, proposant notamment des rendements élevés de production (Ahmad *et al.*, 2014 ; Rosano & Ceccarelli, 2014). Ces espèces n'ont toutefois pas été sélectionnées pour ce projet ; *P. pastoris* est sensible au peptide ETD151 et *E. coli* nécessite une optimisation avec une souche assurant la formation des ponts disulfures en tant que modification post-traductionnelle. Sur la base des travaux de la société EntoMed S.A. (brevet US20030208035A1, 2003 ; Landon *et al.*, 2004), la levure *S. cerevisiae* a été choisie pour l'expression recombinante du peptide ETD151. La première phase a été consacrée à la validation du construit W303 α (pDEF151) préparé en amont de la production (voir Matériels et Méthodes, p. 74). La croissance des souches sauvage W303 α et recombinante W303 α (pDEF151) a été évaluée en milieu synthétique glucose (Glc) et induction galactose (Gal). Les cultures ont été réalisées avec un décalage de 11 h 30, permettant d'intercaler les mesures d'absorbance (DO) et de construire des courbes complètes sur 24 h (Figure 31).

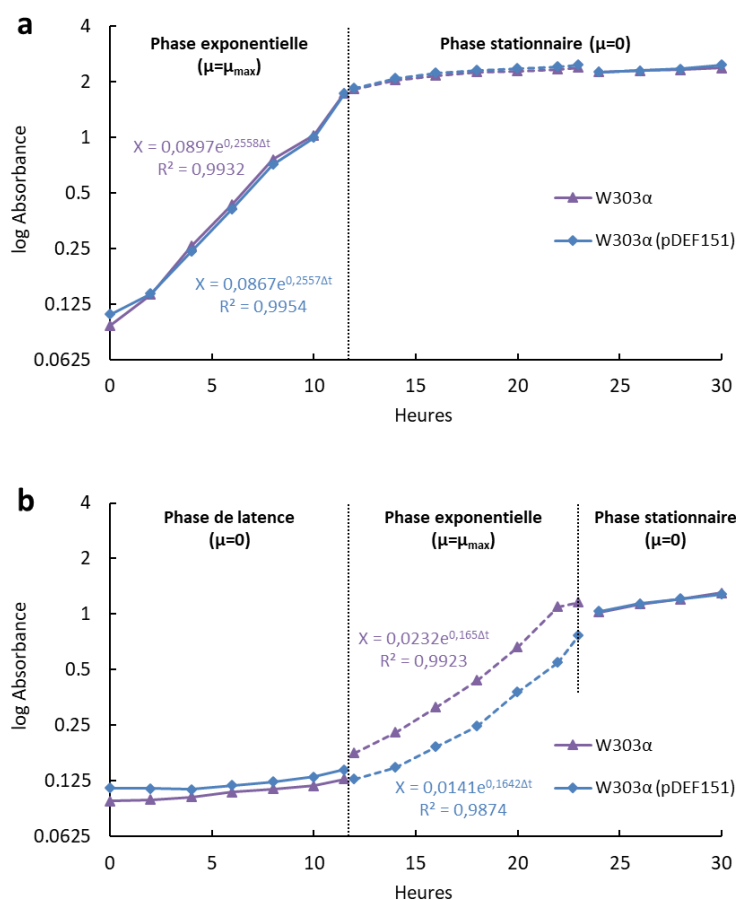


Figure 31. Croissance des souches W303 α et W303 α (pDEF151) en milieu synthétique

Les courbes en milieu (a) glucose et (b) galactose ont été générées par combinaison des mesures d'absorbance (600 nm) de deux séries de cultures, d'une part 0-11 h 30 et 24-30 h et d'autre part 12-23 h (en pointillé). En phase exponentielle, le taux de croissance μ est maximal (μ_{max}) et est déterminé par une régression simple d'équation $X=X_0e^{\mu_{max}\Delta t}$ où X représente la population de levures et Δt un intervalle de temps (h^{-1}). En phase de latence et stationnaire, μ est nul.

En milieu Glc (Figure 31a), W303 α et W303 α (pDEF151) ont affiché des courbes de croissance identiques comprenant notamment une phase de latence assez courte (< 30 min) et une phase de croissance exponentielle (jusqu'à 11 h, DO_{max} = 1,8). Les deux souches ont présenté le même taux de croissance μ_{max} égal à 0,256 h⁻¹. Ce taux était équivalent à un temps de génération¹ t_g de 2,7 h, durée nécessaire pour le doublement de la biomasse en phase exponentielle. Ces données ont démontré que l'ajout du plasmide pDEF151 n'a pas eu d'influence sur la croissance de la levure W303 α en condition de répression.

En milieu Gal (Figure 31b), W303 α et W303 α (pDEF151) ont à nouveau affiché des courbes de croissance très similaires. La phase de latence a été beaucoup plus importante (entre 10 et 12 h) avant la phase exponentielle (environ 12 h, DO_{max} = 1). Pour cette dernière, un décalage dans les relevés d'absorbance est apparu entre les deux souches et pourrait être attribué à l'utilisation de cultures différées contenant des quantités de biomasse légèrement différentes. W303 α et W303 α (pDEF151) ont présenté des taux de croissance μ_{max} semblables, respectivement 0,165 et 0,164 h⁻¹, soit un t_g de 4,2 h logiquement inférieur au résultat en milieu Glc.

Ces résultats ont permis de définir la durée optimale des phases de croissance et d'induction pour la souche W303 α (pDEF151). Pour la suite des travaux, nous avons opté pour 9 à 10 h de croissance en milieu Glc (répression), durée pour atteindre $\frac{2}{3}$ de la DO_{max}, et une induction en milieu Gal jusqu'au début de la phase stationnaire. La physiologie des levures changeant durant la phase stationnaire, nous avons décidé d'éviter cette phase pour la production du peptide recombinant ETD151r.

II.7. Production du peptide recombinant ETD151r par W303 α (pDEF151)

L'expression du peptide ETD151r par la souche W303 α (pDEF151) a été contrôlée de façon analytique en amont de la production du peptide marqué ¹⁵N-ETD151r. Lors de cette phase de développement, les rendements de production ont été estimés à petite et à grande échelle. À l'échelle de 100 mL, la culture en milieu Glc a été incubée pendant 9 h 30 et a atteint une DO_{max} de 1,26. L'induction en milieu Gal a été réalisée pendant 18 h, aboutissant à une DO finale de 2,38 (Figure 32a). Le surnageant a été purifié (voir Matériels et Méthodes, p. 76) et les différentes fractions générées par le procédé ont été analysées sur un gel SDS-PAGE (Figure 32b).

¹ Temps de génération t_g = ln(2) / μ_{max}

L'éluat issu de la purification a été divisé en deux fractions EL1 et EL2 de 5 mL, mais seule EL1 (puits 5) a présenté une bande correspondant à la référence ETD151 pure (puits 6). L'analyse par Western Blot n'a pas permis de confirmer l'attribution de cette bande au peptide ETD151, suggérant que la quantité de peptide était trop faible ou que l'anticorps utilisé (mélange d'épitopes) n'était pas suffisamment sensible. Nous avons cependant considéré que la souche W303 α (pDEF151) avait vraisemblablement bien exprimé le peptide recombinant. Le rendement de production a été quantifié par comparaison des intensités de bandes entre EL1 et une gamme de concentrations en ETD151 (Figure 32c). La concentration relative en ETD151r a ainsi été estimée à 2 $\mu\text{g/L}$.

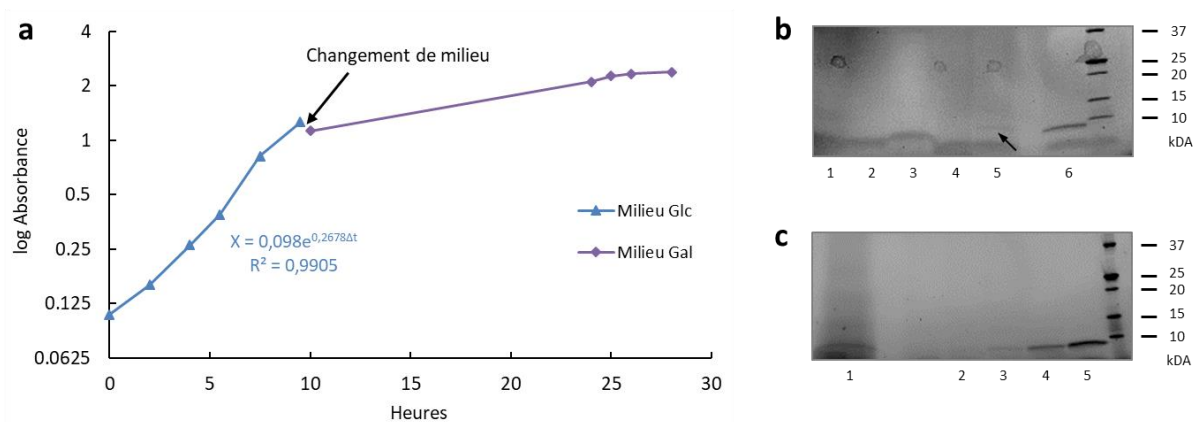


Figure 32. Expression du peptide recombinant ETD151r par la souche W303 α (pDEF151)

(a) Courbes de croissance de la souche W303 α (pDEF151) en milieu Glc et Gal générées par mesure de l'absorbance (600 nm). (b) Analyse sur gel SDS-PAGE des fractions issues de la purification du surnageant d'expression : surnageant non purifié (1), lavages (2 et 3), éluats EL2 et EL1 (4 et 5), référence ETD151 pure (6). (c) Quantification relative sur gel SDS-PAGE du peptide ETD151r dans l'éluat EL1 (1) par rapport à une gamme référence de concentrations en ETD151 : 61,5, 125, 250 et 500 ng (respectivement 2 à 5). Les masses de référence sont fournies par le standard « Precision Plus Protein All Blue » (Bio-Rad) sur la droite des CCM. La flèche indique la bande correspondant à la masse du peptide ETD151.

À l'échelle de 1 litre, les cultures en milieu Glc ont été incubées pendant 9 h 30 et ont atteint une DO_{max} de 1,74. L'induction en milieu Gal a été réalisée pendant 14 h, aboutissant à une DO finale de 2,88. Les éluats EL1 et EL2 obtenus après purification du surnageant d'expression ont été analysés par MALDI-MS (Figure 33). Un ion de m/z 4 839, masse du peptide ETD151, a été identifié dans EL1, confirmant le repliement du peptide lors de son expression par la souche W303 α (pDEF151) (Figure 33a). L'absence du peptide recombinant dans EL2 a attesté le bon déroulement de l'étape d'éluat lors du passage du peptide ETD151r sur les cartouches SPE (Figure 33b). Sans surprise, l'étape de prépurification par extraction en phase solide n'a pas permis d'éliminer toutes les molécules contaminant le peptide recombinant.

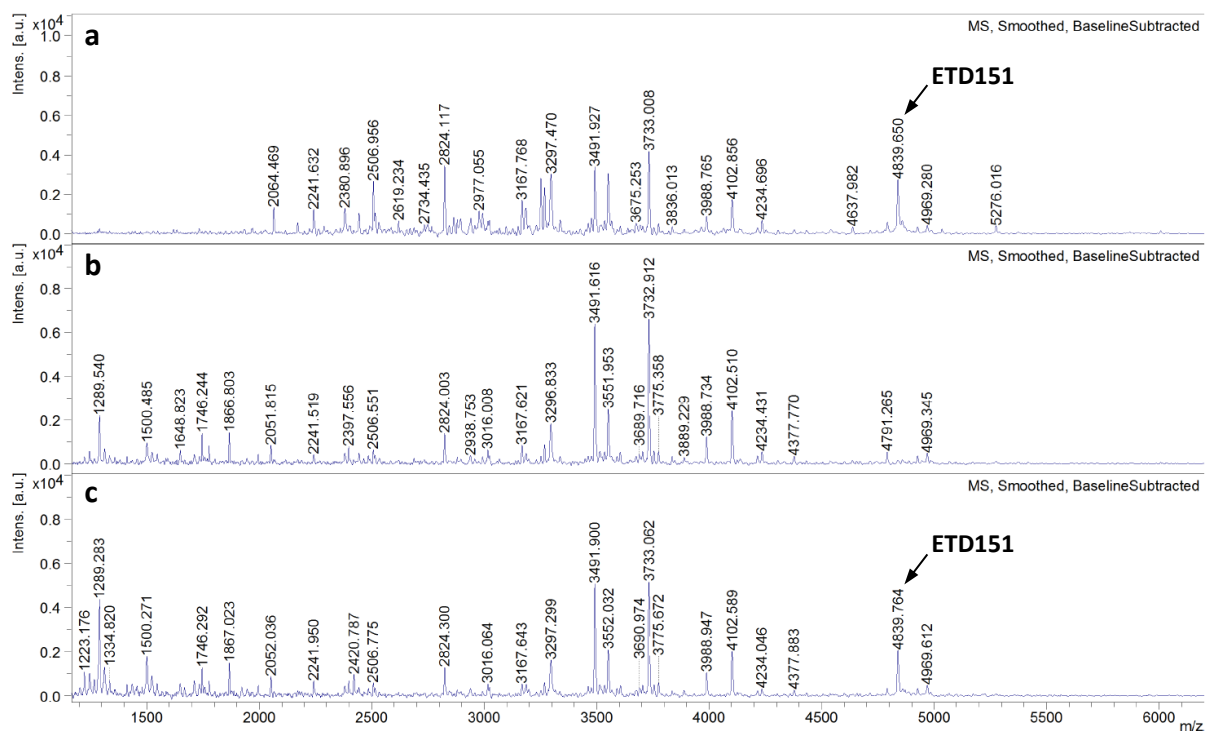


Figure 33. Analyses MALDI-MS du surnageant d'expression après purification

Les spectres de masse des échantillons suivants : (a) EL1, (b) EL2 et (c) EL2 après ajout de 0,5 μL d'une solution pure d'ETD151 à 0,8 $\mu\text{g/mL}$, ont été générés à partir de dépôts dits « goutte séchée » de 1 μL . Les spectres ont été lissés et la ligne de base a été soustraite. L'intensité des ions, placés selon leur rapport masse/charge (m/z), est indiquée en unité arbitraire.

Le rendement de production a été quantifié en déterminant la quantité d'ETD151 pure nécessaire pour obtenir un signal d'intensité identique au pic présent dans EL1. Sur cette base, 0,4 ng d'ETD151 a été ajouté à l'échantillon EL2 pour générer un spectre MALDI-MS dans le même environnement moléculaire et dans les mêmes conditions d'analyses (atténuation et nombre de tirs lasers) que l'échantillon EL1 (Figure 33c). La comparaison des intensités de pics a permis d'estimer la quantité d'ETD151r dans EL1 à 0,6 ng, soit une concentration de 0,6 mg/L dans le surnageant d'expression après purification. Cette valeur est apparue faible par rapport aux 3 à 8 mg/L attendus pour l'expression de cette défensine chez *S. cerevisiae* et obtenus par la société EntoMed S.A. lors de la production en fermenteur (Landon *et al.*, 2004). Plusieurs contrôles ont été effectués sur les fractions générées lors des différentes étapes de concentration et purification (chargement, lavage, éluat) sans mettre en lumière une perte significative de produit.

À la recherche d'une explication pour ce faible rendement de production, l'hypothèse d'une mauvaise sécrétion du peptide ETD151r par la souche W303 α (pDEF151) a été évaluée. Les protéines du culot de levures ont été extraites et purifiées sur cartouches SPE. L'éluat de ces échantillons complexes a été fractionné selon trois concentrations en ACN/TFA 0,1 % (15, 40 et 60 %) avant analyse par MALDI-MS (Figure 34).

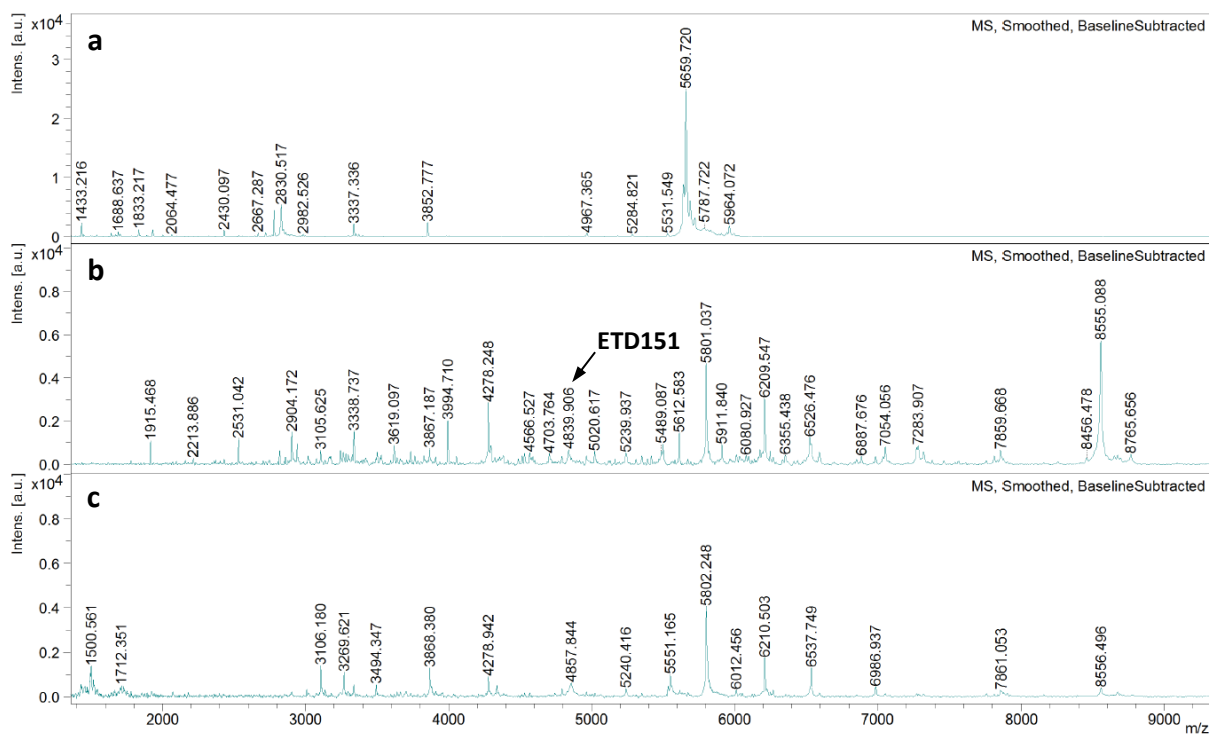


Figure 34. Analyses MALDI-MS du culot de levures après purification

Les spectres de masse des échantillons dilués 10x suivants : (a) éluat ACN 15 %, (b) éluat ACN 40 % et (c) éluat ACN 60 %, ont été générés à partir de dépôts dits « goutte séchée » de 1 μ L. Les spectres ont été lissés et la ligne de base a été soustraite. L'intensité des ions, placés selon leur rapport masse/charge (m/z), est indiquée en unité arbitraire.

Un ion de m/z 4 839, associé au peptide ETD151, a été identifié uniquement dans l'éluat ACN 40 % (Figure 34b). L'intensité de cet ion étant assez faible en comparaison de la population protéique de l'échantillon, la quantité d'ETD151r non sécrétée par la souche W303 α (pDEF151) apparaîtrait comme négligeable.

Un ion très intense de m/z 5 659 détecté dans l'éluat ACN 15 % a retenu notre attention (Figure 34a). Cette valeur nous a conduit à examiner l'hypothèse d'une forme mal maturée du peptide ETD151r. La séquence du précurseur preBGL2 a été découpée acide aminé par acide aminé afin d'identifier un fragment non clivé, de masse 5 659 – 4 839 = 820 Da, et pouvant empêcher la sécrétion du peptide (Annexe 4). Cette approche n'a pas permis de discerner un fragment candidat, infirmant cette hypothèse.

Malgré les investigations, il n'a pas été possible d'identifier le facteur limitant la production du peptide recombinant ETD151r. La combinaison souche/promoteur choisie, avec notamment une auxotrophie pour plusieurs acides aminés, pourrait être responsable des faibles rendements observés. La culture en erlenmeyers a été transposée à une étude pilote en fermenteur (approche utilisée par EntoMed S.A.) afin d'améliorer le rendement de production du peptide ETD151r par la souche W303 α (pDEF151) et avant le passage à la production du peptide ETD151r marquée ¹⁵N.

II.8. Production du peptide recombinant ETD151r en fermenteur

La culture en réacteur et les contraintes associées ont demandé d'adapter la méthode développée en erlenmeyers. Le maintien d'un environnement stérile pendant toute la production n'était notamment pas compatible avec l'obtention d'un culot de levures lors du changement de milieu. Nous avons choisi pour cette étude pilote de travailler avec un milieu synthétique appauvri en Glc (30 % final). L'objectif était de forcer la souche W303 α (pDEF151) à consommer la totalité du Glc disponible avant d'initier la phase d'expression par un ajout de Gal. L'analyse de la courbe de croissance a révélé un blocage dès l'ajout du milieu Gal à 9 h (Figure 35). Le taux de croissance de 0,268 h⁻¹ en milieu Glc ($t_g = 2,6$ h) n'a atteint que 0,025 h⁻¹ en milieu Gal ($t_g = 28,3$ h). De plus, aucune trace d'ETD151r n'a été détectée lors de l'analyse partielle du surnageant de culture. Ce résultat nous a obligé à repenser considérablement la stratégie d'expression du peptide recombinant. Pour garantir l'obtention d'une quantité suffisante de peptide ¹⁵N-ETD151r, cette phase du projet a été externalisée et confiée à la société Promise (Grenoble, France), spécialisée dans la production de protéines recombinantes.

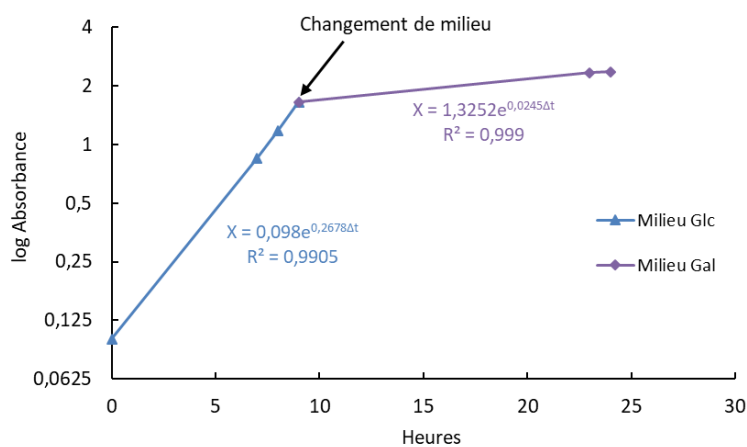


Figure 35. Croissance de la souche W303 α (pDEF151) en fermenteur
 Courbe de croissance générée par mesure de l'absorbance à 600 nm.
 L'ajout du milieu Gal est opéré après 9 h d'incubation en milieu Glc.

II.9. Production du peptide recombinant marqué ^{15}N -ETD151r

La société Promise a basé sa stratégie de production hétérologue sur une souche de *S. cerevisiae* prototrophe (Genotype Mata α ura3) et un vecteur d'expression portant le promoteur constitutif fort TEF (Gatignol *et al.*, 1990 ; Partow *et al.*, 2010). La phase de développement en erlenmeyers (voir Matériels et Méthodes, p. 79) a permis de valider un transformant et d'estimer son rendement d'expression (4,8 mg/L) en ^{15}N -ETD151r. La phase de production sur 4 litres de culture a conduit à l'obtention de 4,8 mg de peptide ETD151r pur et marqué isotopiquement ^{15}N à plus de 96 %. À la réception du produit, la pureté et le marquage isotopique du peptide ^{15}N -ETD151r ont été validés par MALDI-MS (Annexe 5).

Conclusion

Dans un premier temps et à l'aide de mutants Δgcs de *C. albicans* et *P. pastoris*, nous avons démontré le rôle prépondérant des glucosylcéramides dans le mécanisme d'action de la défensine antifongique ETD151. Le gène *GCS* étant identifié chez *B. cinerea*, il serait possible de préparer un mutant Δgcs de notre champignon et de confirmer les données obtenues pour les levures. Par la suite, trois glucosylcéramides *Bc-GlcCer-1*, *Bc-GlcCer-2* (d18:2/h16:1) et *Bc-GlcCer-3* (d18:2/h16:0) ont été identifiés par spectrométrie de masse dans des extraits lipidiques membranaires de *B. cinerea*. Les deux premiers composés nécessiteront de nouvelles analyses LC-ESI-MS/MS afin de caractériser complètement leurs structures. Ces données ont toutefois permis de valider l'existence des GlcCer chez *B. cinerea*, à l'instar de la majorité des espèces fongiques, et pourraient expliquer la sensibilité du champignon face au peptide ETD151.

Afin d'étudier les interactions au niveau atomique entre le peptide antifongique et les GlcCer, il est nécessaire de disposer de chaque partenaire en quantité et pureté requises par la RMN. De plus, le peptide ETD151 doit être marqué uniformément à l'azote 15 (^{15}N -ETD151r). L'expression recombinante mise en place chez *S. cerevisiae* s'est révélée insuffisante et a conduit à l'externalisation de la production auprès de la société spécialisée Promise. Initialement prévus dans le cadre de la thèse, ces études n'ont pas pu débuter lors de ma dernière année en raison des difficultés rencontrées pour l'expression du peptide ^{15}N -ETD151r et du retard accumulé. Elles ont donc été entreprises par les Drs Céline Landon et Françoise Paquet au Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans. Les données de RMN permettront de définir au niveau atomique les régions du peptide ETD151 principalement touchées lors de l'interaction avec les GlcCer.

Ne disposant pas de quantité pure de glucosylcéramides de *B. cinerea*, le GlcCer de soja, commercial et quasi identique au composé *Bc-GlcCer-3* identifié par sphingolipidomique, a été sélectionné comme modèle pour les études d'interaction. Les données seront générées sur deux modèles de membranes permettant l'insertion des GlcCer : des micelles de DPC contenant 10 % de GlcCer d'une part et des vésicules unilamellaires de PC (LUVs, \varnothing 100 nm) contenant 10 % de GlcCer d'autre part. Les résultats obtenus seront comparés aux deux études décrites dans la littérature pour les défensines de plantes Psd1 (de Medeiros *et al.*, 2010) et Sd5 (canne à sucre *Saccharum officinarum*) (de Paula *et al.*, 2011). À plus long terme, le même type d'étude pourra être réalisé sur des GlcCer directement purifiés de *B. cinerea*.

CHAPITRE III.

Analyse du mécanisme d'action par
des approches de microscopie

Introduction

Les équipes du Centre de Recherche de La Dargoire se consacrent chaque année à la découverte et l'évaluation de nouvelles molécules et solutions antifongiques. Dans ce cadre, les chercheurs se sont intéressés dès 2011 au peptide antifongique ETD151 et à son spectre d'activité sur des champignons d'intérêt agronomique. Suite aux tests d'activité biologique *in vitro* et *in vivo*, les investigations se sont orientées en 2014 vers l'étude du mécanisme d'action du peptide. Le diagnostic conduit en interne sur les différentes classes du « Fungicide Resistance Action Committee » (voir Introduction, p. 27) avait mis en évidence : d'une part, un phénomène de perméabilisation membranaire sur le champignon *Septoria tritici* (septoriose du blé) en présence de 2 μM d'ETD151, et d'autre part une inhibition de la consommation en oxygène pour des mitochondries isolées du champignon *Agaricus bisporus* à partir de 6,2 μM d'ETD151. Tous les autres tests ressortant négatifs, le diagnostic avait conclu à un mécanisme d'action inédit pour ce peptide antifongique (données Bayer CropScience).

Pour tenter de répondre à cette interrogation, le mécanisme d'action du peptide ETD151 sur le champignon *Botrytis cinerea* a été appréhendé durant cette thèse au travers d'études protéomiques (voir Chapitre I). Ces travaux ont révélé des protéines et des voies métaboliques significativement impactées par le peptide ETD151, dont la voie impliquée dans l'intégrité de la paroi cellulaire (Cell Wall Integrity).

En complément de cette approche, les modifications morphologiques induites par le peptide sur le champignon *B. cinerea* ont été étudiées en microscopie optique et à fluorescence, notamment en présence du marqueur de perméabilité membranaire SYTOX Green (Thevissen *et al.*, 1999). Le phénotype du champignon traité avec ETD151 pourrait nous aider à construire une hypothèse sur le mécanisme d'action du peptide et à orienter les axes suivants de recherche.

Enfin, l'identification des glucosylcéramides comme probable partenaire membranaire du peptide ETD151 (voir Chapitre II) a motivé le développement d'une approche de marquage du peptide par un fluorophore et l'identification par microscopie confocale de sa localisation subcellulaire chez le champignon *B. cinerea*.

Ce chapitre intègre des illustrations sous la forme de vidéos « time-lapse » générées en microscopie à fluorescence et confocale. Les liens d'accès sont fournis par des QR codes lisibles depuis n'importe quelle application mobile dédiée. Pour visionner les vidéos dans une qualité optimale, il est conseillé d'augmenter la luminosité de son écran et de choisir l'option haute définition (1080p) lorsque celle-ci est disponible.

Résultats et Discussions

III.1. Cinétique de croissance du champignon *B. cinerea*

En amont des premières observations de modifications morphologiques induites par le peptide ETD151 sur le champignon *B. cinerea*, la cinétique de germination des spores a été établie dans nos conditions expérimentales (10^4 sp/mL en milieu PDB $\frac{1}{4}$) (Figure 36). Peu d'informations sont disponibles à ce sujet dans la littérature. En effet, les étapes de germination et d'élongation peuvent être affectées par de nombreux paramètres tels que la composition du milieu, la souche utilisée ou les conditions de culture (Nassr & Barakat, 2013). Dans nos conditions expérimentales, nous avons relevé premièrement que les deux souches du champignon *B. cinerea* utilisées (B047 et B0510) étaient morphologiquement très semblables. La cinétique de germination détaillée ici sera illustrée par la souche B047 (Figure 36), majoritairement employée durant ces travaux de thèse. Après 3 h d'incubation dans le milieu PDB $\frac{1}{4}$, les spores ont formé un bouton germinatif (Figure 36b). Cette structure post-germination a évolué sous la forme d'un tube germinatif dans les 3 h suivantes (Figure 36c). Le tube a poursuivi son élongation jusqu'à l'apparition de jeunes hyphes composant un réseau mycélien en moins de 24 h (Figure 36d). Ces données ont été essentielles afin d'établir une référence pour la suite de ce chapitre et mettre en évidence une inhibition de la germination, de l'élongation ou des modifications morphologiques en présence du peptide antifongique ETD151.

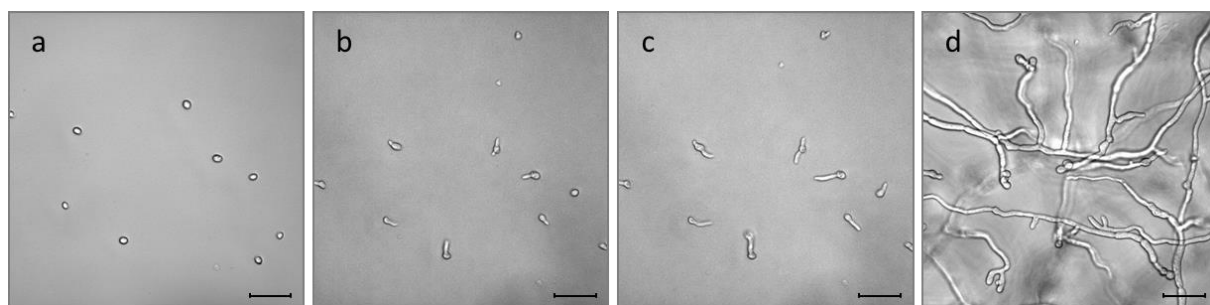


Figure 36. Germination des spores et élongation du tube germinatif chez le champignon *B. cinerea*

Observations réalisées sur la souche B047 (10^4 sp/mL en milieu PDB $\frac{1}{4}$) par microscopie en lumière transmise et grossissement optique 40x. (a) spores à T0, (b) boutons et tubes germinatifs à 3 h, (c) élongation des tubes germinatifs à 6 h et (d) jeune mycélium à 24 h. Barre d'échelle = 50 μ m.

III.2. Activité du peptide ETD151 sur les spores du champignon *B. cinerea*

En amont des études de protéomique, l'activité du peptide ETD151 a été déterminée sur des hyphes (trois jours de croissance préalable) de la souche B047 de *B. cinerea* (voir Chapitre I). Dans le cadre de l'approche de microscopie, l'activité du peptide antifongique a été évaluée à 3 et 7 jours sur les spores du champignon *B. cinerea*, souches B047 et B05.10, et selon les conditions expérimentales citées précédemment. Les courbes d'inhibition de la croissance du champignon *B. cinerea* à 3 et 7 jours ont été tracées afin de valider la gamme de concentrations en ETD151 pour les études de phénotypage à venir (Figure 37).

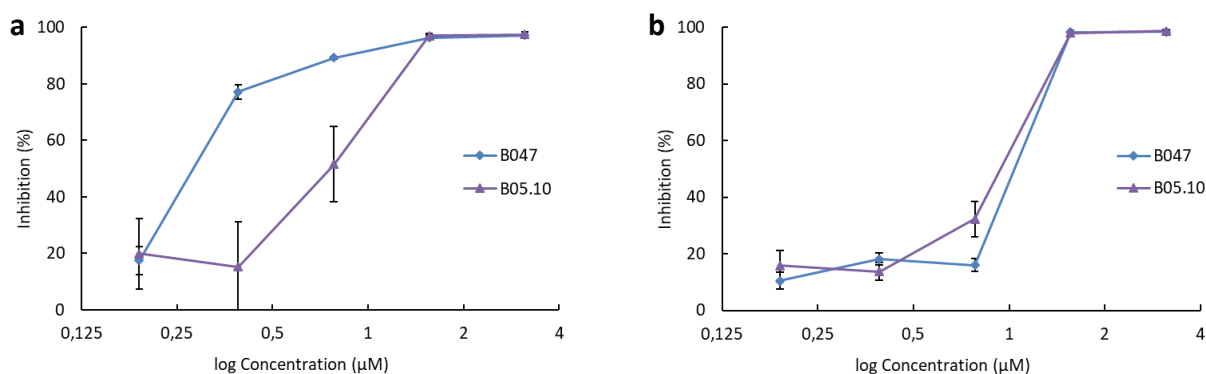


Figure 37. Inhibition de la croissance du champignon *B. cinerea* en présence du peptide ETD151

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon un rapport des mesures d'absorbance à 620 nm pour des spores des souches B047 et B05.10 (10^4 sp/mL en milieu PDB $\frac{1}{4}$) en absence et en présence du peptide ETD151. Les courbes sont établies (a) 3 jours et (b) 7 jours après ajout du peptide. Les données sont obtenues en triplicata et représentées sous la forme d'une moyenne \pm écart type.

Dans les trois premiers jours de traitement (Figure 37a), la souche B047 du champignon *B. cinerea* ($CI_{50-3j} = 0,28 \mu\text{M}$) s'est avérée plus sensible à ETD151 que la souche B05.10 ($CI_{50-3j} = 0,72 \mu\text{M}$). Après 7 jours de traitement (Figure 37b), les deux courbes sont apparues similaires et n'ont pas permis de faire une distinction entre les souches B047 et B05.10 ($CI_{50-7j} \approx 1 \mu\text{M}$).

Une gamme de concentrations en ETD151, de 0,19 à 3,12 μM final, avait été sélectionnée pour les études de protéomique. Des concentrations identiques ont été testées pour évaluer l'activité sur les spores de *B. cinerea* et ont permis d'obtenir les profils complets d'inhibition des souches B047 et B05.10. Ces valeurs en ETD151 ont ainsi été maintenues pour l'approche de microscopie. Enfin, nous avons privilégié la souche B047 pour le phénotypage, étant utilisée majoritairement au cours des travaux de thèse et également plus sensible dans les premiers jours de traitement.

III.3. Phénotypage du champignon *B. cinerea* en présence du peptide ETD151

L'effet du peptide ETD151 sur la germination des spores a été évalué par microscopie optique (grossissement 10x) (Figure 38), parallèlement à des observations détaillées (grossissement 40x) (Figure 39). Le peptide ETD151 a inhibé la germination des spores et l'élongation du tube germinatif dès l'ajout d'une faible concentration. À 6 h, seulement 21 % des spores ont germé en présence de 0,39 μM , par opposition avec le contrôle et un taux de germination de 96 %. Sans surprise, l'efficacité du peptide a augmenté proportionnellement avec la concentration pour atteindre une inhibition presque totale de la germination. À 24 h, 80 % contre 11 % des spores ont germé respectivement en présence de 0,39 μM et 3,12 μM d'ETD151. Les observations ont été effectuées jusqu'à une concentration de 25 μM (données non présentées) et ont confirmé l'inhibition complète de la germination durant les 72 heures suivant l'ajout du peptide.

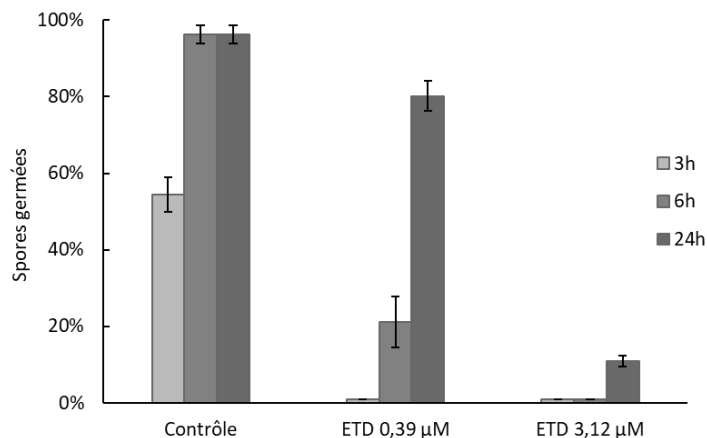


Figure 38. Effet du peptide ETD151 sur la germination des spores de *B. cinerea*
Taux de germination calculés par observation en lumière transmise et grossissement optique 10x sur une population de 100 spores de la souche B047 (10^4 sp/mL en milieu PDB ¼). Les données obtenues sont issues de deux répétitions en triplicata et représentées sous la forme d'une moyenne \pm écart type.

Additionnellement à ce phénomène d'inhibition (Figure 39a,d), nous avons mis en évidence une libération du contenu cytoplasmique dans le milieu, à l'image des défensines d'insectes drosomycine et héliomicine (Banzet *et al.*, 2002 ; Aerts *et al.*, 2008) (Tableau 10). Les premières observations en lumière transmise pointeraient une lyse localisée à l'extrémité apicale du tube germinatif pour une dose de 0,39 μM (Figure 39b) et au niveau du bouton germinatif pour une dose de 3,12 μM (Figure 39e). Lors de la formation du tube germinatif et durant l'élongation des hyphes, l'intégrité cellulaire est maintenue durant la synthèse des nouveaux constituants pariétaux (Steinberg *et al.*, 2017). Toutefois, l'apex des hyphes où la paroi est amincie représente une zone de faiblesse chez les champignons filamenteux et semblerait affecté directement ou indirectement par le mécanisme d'action de ETD151.

Tableau 10. Effets des défensines de plantes et d'insectes sur la morphologie et l'intégrité cellulaire des champignons cibles

Extrait des données présentes dans la littérature. Les valeurs sont indiquées sous la forme de concentration inhibitrice exprimées en micromolaire (μM).

	Partenaires membranaires	Espèces fongiques	Inhibition		Perturbation			Références
			Élongation des hyphes	Germination des spores	Ramification	Intégrité membranaire	Fuite de matériel cytoplasmique	
MsDef1	GlcCer, PI(3,5)P ₂	<i>N. crassa</i>	-	-	oui	oui	oui	Spelbrink <i>et al.</i> , 2004 ; Muñoz <i>et al.</i> , 2014
Psd1	GlcCer, ergostérol	<i>N. crassa</i>	-	-	nd	oui	nd	Lobo <i>et al.</i> , 2007
VvAMP2	nd	<i>B. cinerea</i>	-	-	oui	oui	nd	Giacomelli <i>et al.</i> , 2012 ; Nanni <i>et al.</i> , 2014
RsAFP2	GlcCer	<i>C. albicans</i>	-	-	nd	oui	nd	Thevissen <i>et al.</i> , 2004, 2012
Drosomycine	Sphingolipides	<i>B. cinerea</i>	2,0	4,1	oui	nd	oui	Banzet <i>et al.</i> , 2002 ; B. Gao & Zhu, 2008
Héliomicine	GlcCer	<i>B. cinerea</i>	4,2	20,9	oui	nd	oui	Banzet <i>et al.</i> , 2002
ETD151	GlcCer	<i>B. cinerea</i>	0,2	1,6	oui	oui	oui	Travaux de thèse

nd : non déterminé

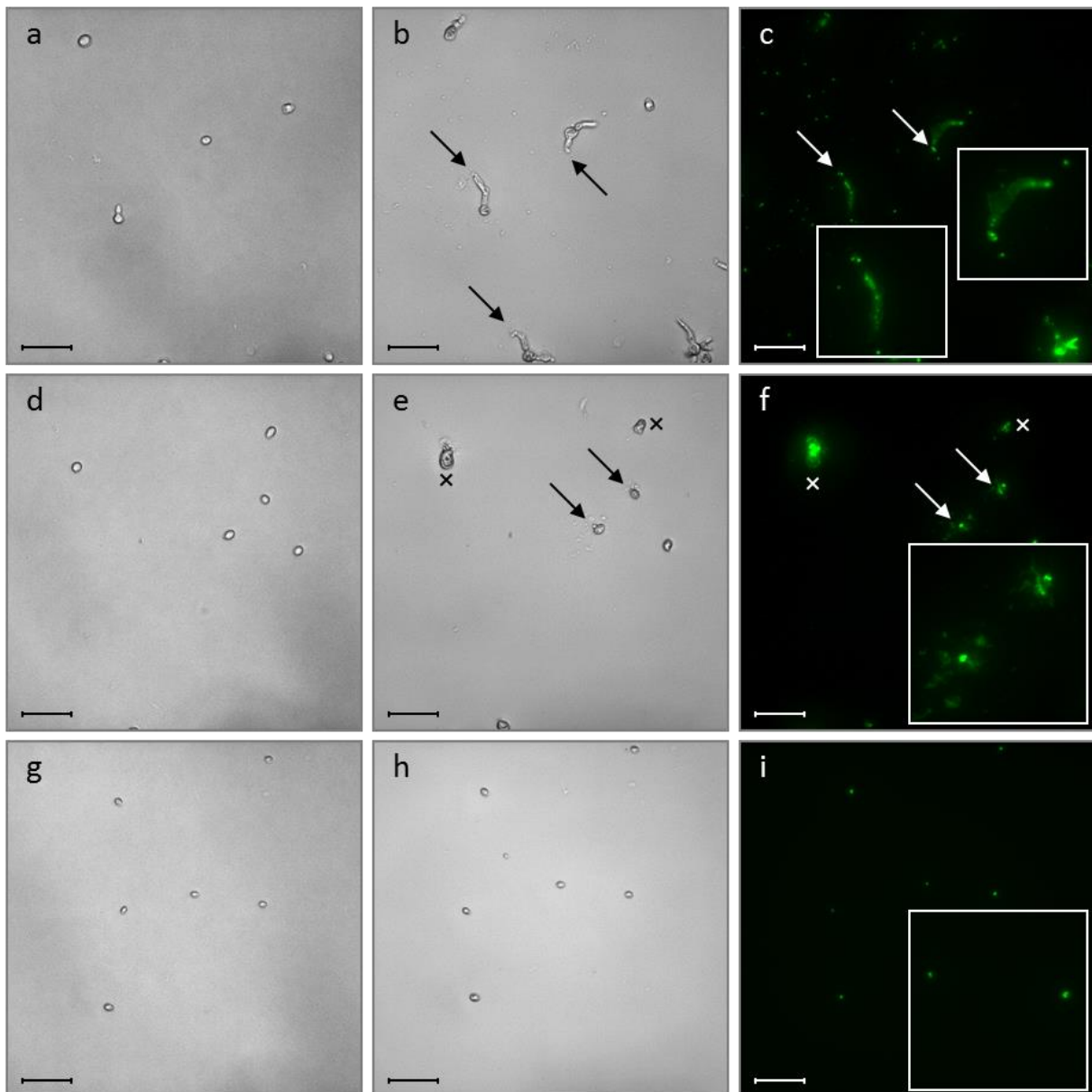


Figure 39. Phénotypage sur spores du champignon *B. cinerea* en présence du peptide ETD151 et du suloctidil

Observations pour un grossissement optique 40x des spores de la souche B047 (10^4 sp/mL en milieu PDB $\frac{1}{4}$) en lumière transmise respectivement 6 h et 24 h après addition de (a, b) $0,39 \mu\text{M}$ ETD151, (d, e) $3,12 \mu\text{M}$ ETD151, et (g, h) $100 \mu\text{M}$ suloctidil. (c, f, i) Observations à 24 h en présence du marqueur SYTOX Green fluorescent pour les trois conditions mentionnées précédemment. Les flèches indiquent la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu. Les croix marquent des spores gonflées. Les encadrés correspondent à un zoom numérique 2x. Barre d'échelle = $50 \mu\text{m}$.

L'effet du peptide antifongique sur la perméabilité membranaire a été évalué en présence du marqueur SYTOX Green et en comparant les résultats avec le suloctidil, un perturbateur membranaire de référence (Spitzer *et al.*, 2011). Ce composé perfore la membrane plasmique des levures et des champignons filamenteux, tel que *B. cinerea*. Le SYTOX Green a permis de vérifier la viabilité cellulaire de par sa forte affinité avec les acides nucléiques. Un signal fluorescent est émis lorsque l'intégrité de la membrane plasmique est compromise et le matériel intracellulaire est accessible (Thevissen *et al.*, 1999).

Le signal SYTOX Green a été détecté en présence de 0,39 et 3,12 μM d'ETD151 (Figure 39c,f). Une différence a toutefois été notée dans l'intensité des signaux fluorescents : les zones les plus intenses indiquant les sites de lyse et les zones plus faibles traduisant une diffusion du marqueur SYTOX Green dans les hyphes, post-lyse. En présence de suloctidil, la perméabilisation membranaire du champignon *B. cinerea* est très rapide avec 93 % des spores marquées par le SYTOX après 3 h de traitement (Figure 40). À 24 h, le signal fluorescent est beaucoup plus homogène pour l'ensemble des spores que dans le cas du peptide antifongique (Figure 39h,i).

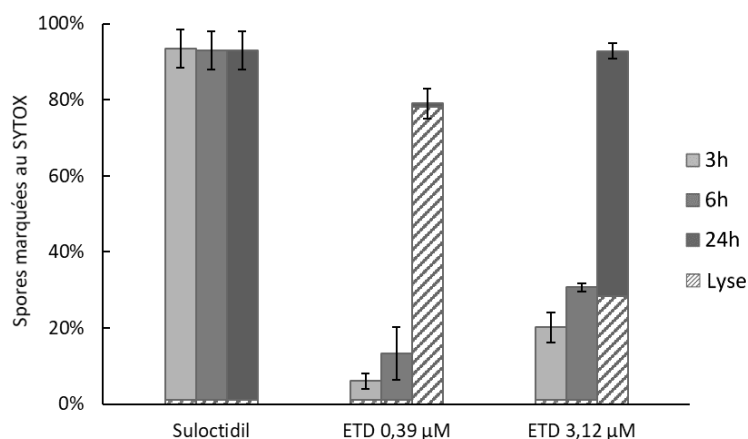
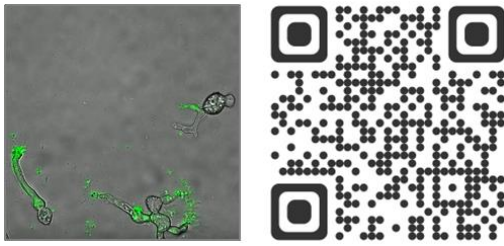


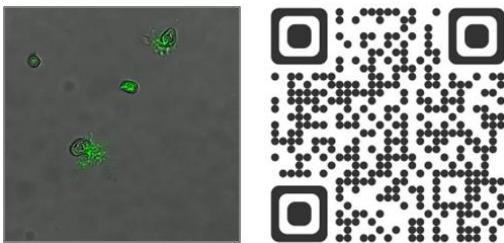
Figure 40. Effet du peptide ETD151 sur la perméabilité membranaire chez *B. cinerea*
Taux de marquage SYTOX et taux de lyse calculés par observation en lumière transmise et en fluorescence, grossissement optique 10x sur une population de 100 spores de la souche B047 (10^4 sp/mL en milieu PDB $\frac{1}{4}$). Les données obtenues sont issues de deux répétitions en triplicata et représentées sous la forme d'une moyenne \pm écart type.

La perméabilisation de la membrane plasmique est une tendance présente dans le mode d'action antifongique de nombreuses défensines de plantes (Thevissen *et al.*, 1999 ; Cools *et al.*, 2017a) (Tableau 10). Le comptage des spores marquées SYTOX et lysées en présence du peptide ETD151 a mis en évidence un phénomène de perméabilisation membranaire dose-dépendant (Figure 40). En effet, à faible concentration (ici 0,39 μM), le marquage SYTOX Green (79 % à 24 h) semblerait lié spécifiquement à la lyse apicale observée (79 %). Au contraire, à forte concentration (ici 3,12 μM), de nombreuses spores (65 % à 24 h) ont perdu leur intégrité membranaire de façon passive ; aucune zone de lyse ou de libération du contenu cytoplasmique n'a pu être identifiée. Ces données ont permis d'éliminer un mécanisme de perméabilisation membranaire du type « insertion dans la membrane » ou « formation de pores », déjà rapporté pour certaines classes de PAMs (Hegedüs & Marx, 2013). Afin d'améliorer notre compréhension du mécanisme d'action du peptide ETD151, la cinétique des modifications morphologiques induites chez *B. cinerea* a été étudiée.

**Vidéo 1. Time-lapse 24 h en présence de 0,39 μ M ETD151**

Observation des modifications morphologiques induites sur une suspension de spores de la souche B047 (10^4 sp/mL en milieu PDB ¼) par 0,39 μ M d'ETD151 et sur 24 h. Mesures en lumière transmise et fluorescence (SYTOX), à l'aide d'un grossissement optique 60x. La vidéo a été assemblée à partir de 48 images prises à un intervalle de 30 min (8 images/s).

La chronologie des effets observés chez le champignon *B. cinerea* a été établie sur une durée de 24 h à l'aide de deux vidéos « time-lapse » en présence de 0,39 et 3,12 μ M d'ETD151. À une concentration de 0,39 μ M (Vidéo 1), plusieurs spores germantes ont été lysées au niveau de leurs tubes germinatifs aboutissant à la libération du contenu cytoplasmique et l'apparition du signal SYTOX Green. Les lyses apicales successives réduiraient la capacité du champignon *B. cinerea* à établir une croissance polarisée des hyphes et entraîneraient une hyper-ramification autour des spores ou des zones d'embranchement.

**Vidéo 2. Time-lapse 24 h en présence de 3,12 μ M ETD151**

Observation des modifications morphologiques induites sur une suspension de spores de la souche B047 (10^4 sp/mL en milieu PDB ¼) par 3,12 μ M d'ETD151 et sur 24 h. Mesures en lumière transmise et fluorescence (SYTOX), à l'aide d'un grossissement optique 60x. La vidéo a été assemblée à partir de 48 images prises à un intervalle de 30 min (8 images/s).

À une concentration de 3,12 μ M (Vidéo 2), deux phénotypes ont été identifiés pour le champignon *B. cinerea*. D'une part, plusieurs spores ne présentant pas de modifications morphologiques ont été marquées par le SYTOX Green environ 8 h après l'ajout du peptide, suggérant une perméabilisation membranaire passive. D'autre part, plusieurs spores ont progressivement gonflé au cours des 24 h, atteignant 2 à 3 fois leurs diamètres initiaux. Le bouton germinatif apparaîtrait comme la zone de rupture de l'intégrité cellulaire. Ce gonflement des spores a été identifié dans une moindre mesure pour 0,39 μ M d'ETD151.

Dans nos conditions expérimentales, le peptide ETD151 peut être défini comme une défensine morphogénique chez *B. cinerea*. L'inhibition de la germination et de l'élongation est combinée à des altérations morphologiques de la structure du champignon, à l'image de certaines défensines de plantes (Broekaert *et al.*, 1995 ; Osborn *et al.*, 1995) (Tableau 10). Les phénotypes détaillés précédemment ont été confirmés sur des jeunes hyphes traités avec ETD151. Les hyphes sont lysés de façon apicale dès la première heure de traitement (Figure 41a,d), créant des zones d'hyper-ramification dans les premières 24 h (Figure 41b,e) et perturbant localement l'intégrité membranaire du champignon *B. cinerea* (Figure 41c,f). Le phénotype obtenu en présence de suloctidil (Figure 42g-i) a également confirmé la différence de mécanisme d'action par rapport au peptide ETD151.

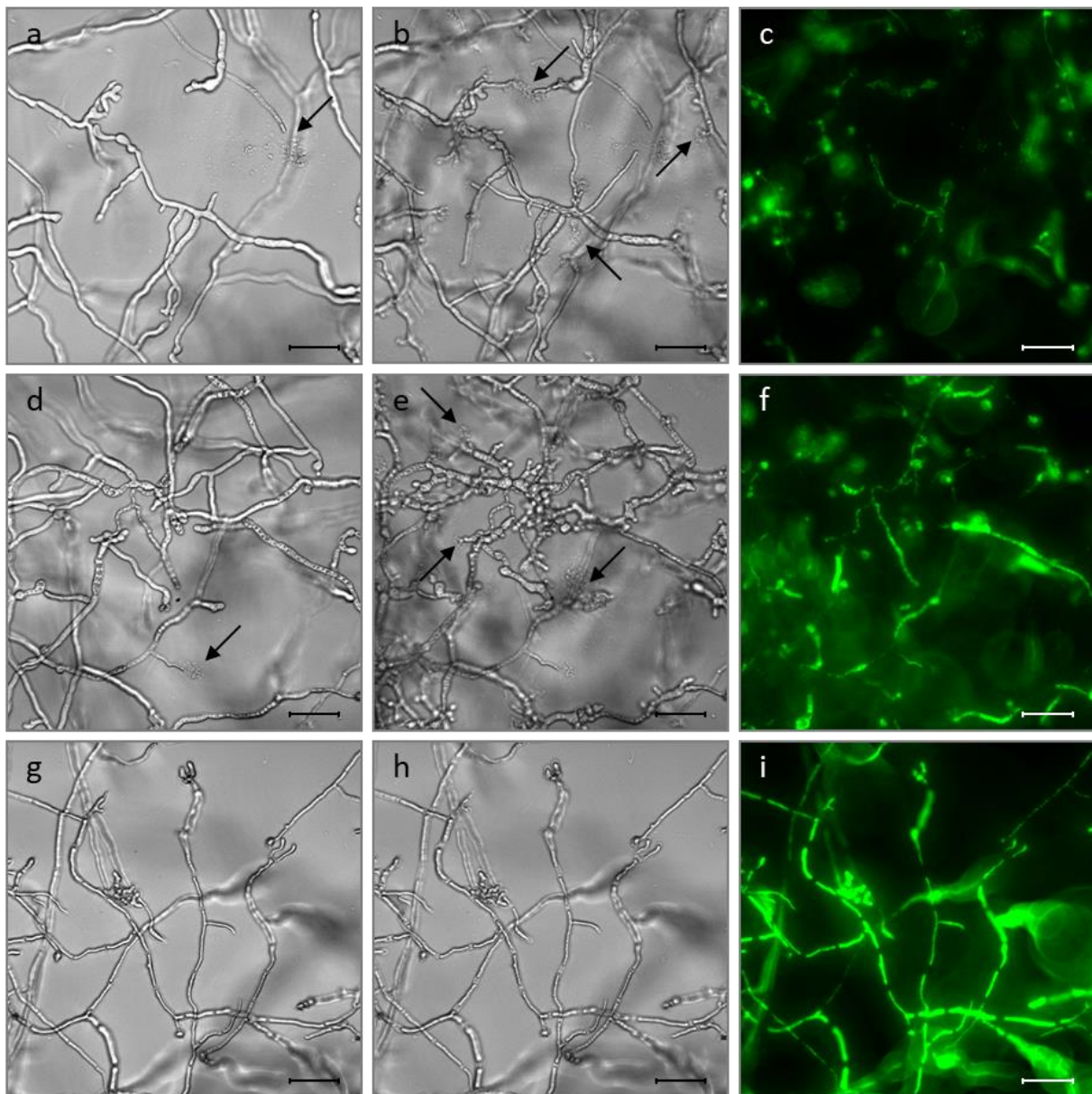


Figure 41. Phénotypage sur mycélium du champignon *B. cinerea* en présence d'ETD151 et de suloctidil

Observations pour un grossissement optique 40x du mycélium de la souche B047 (10^4 sp/mL en milieu PDB $\frac{1}{4}$) en lumière transmise respectivement 1 h et 24 h après addition de (a, b) $0,39 \mu\text{M}$ ETD151, (d, e) $3,12 \mu\text{M}$ ETD151, et (g, h) $100 \mu\text{M}$ suloctidil. (c, f, i) Observations à 24 h en présence de SYTOX Green pour les trois conditions mentionnées précédemment. Les flèches indiquent la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu. Barre d'échelle = $50 \mu\text{m}$.

Un profil phénotypique associant l'inhibition de la germination, le gonflement des spores et l'éclatement du matériel fongique a également été reporté chez plusieurs champignons phytopathogènes, dont *B. cinerea*, en présence d'iprodione (famille des dicarboximides) ou de fludioxonil (famille des phénylpyrolles) (Leroux *et al.*, 1992 ; Zhang *et al.*, 2002). Ces composés agissent sur la voie de signalisation dite MAP kinase « High-Osmolarity Glycerol » (HOG) régulant la réponse à une hyperosmolarité. L'accumulation de glycérol intracellulaire conduit à une situation d'hypotonie générant une pression de turgescence trop importante (entrée du milieu extracellulaire) (Corran *et al.*, 2012). Suite aux observations précédentes, l'effet direct du peptide ETD151 sur la voie dite HOG a été évalué.

III.4. Perturbation de la voie osmorégulatrice HOG

Cette hypothèse a été testée une première fois en 2014 dans le cadre du diagnostic « mode d'action ». L'activité du peptide ETD151 sur la voie HOG avait été évaluée chez *B. cinerea* par mesure de la concentration en glycérol intracellulaire. Les ratios traité/contrôle à 6 h n'avaient pas augmenté significativement, avec des valeurs inférieures ou égales à 2 pour 0,41 et 4,1 μM d'ETD151. En comparaison, les ratios traité/contrôle étaient respectivement de 4 et 16 pour 0,9 et 9 μM d'iprodione. Suite aux derniers résultats de phénotypage, l'activité du peptide ETD151 sur la voie HOG a été réévaluée sur une durée de 24 h (Figure 42).

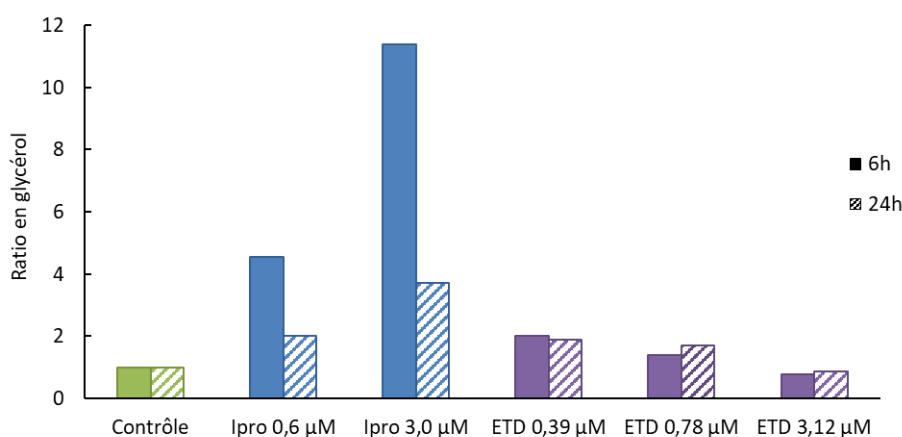


Figure 42. Dosage du glycérol intracellulaire chez *B. cinerea*

Ratio des concentrations en glycérol (en g/L) entre un échantillon traité et un échantillon contrôle DMSO. Mesures pour l'iprodione (Ipro) à CI_{50} (0,6 μM) et CI_{80} (3,0 μM). Mesures pour ETD151 (ETD) à CI_{50} (0,39 μM), CI_{80} (0,78 μM) et 8 x CI_{50} (3,12 μM).

Les ratios traités/contrôle n'ont pas augmenté significativement en présence du peptide antifongique. Une valeur maximale de 2 a été obtenue pour 0,39 μM d'ETD151 à 6 h, soit 2 et 5 fois moins que la référence iprodione pour des concentrations respectives de 0,6 et 3,0 μM . Les mesures effectuées à 24 h n'ont pas apporté d'éléments nouveaux, les ratios pour ETD151 étant proches des valeurs à 6 h. Ces données ont ainsi confirmé que le peptide ETD151 n'interagissait pas avec la voie HOG. Cette conclusion est en adéquation avec les résultats des études protéomiques différentielles. En effet, la protéine Bcin15p03580 (Bcsak1 ou HOG1), activée durant l'osmorégulation, a bien été identifiée dans les extraits mycéliens de *B. cinerea* mais n'a pas été retenue parmi les protéines significativement modulées en présence d'ETD151. Les travaux sur le mécanisme d'action du peptide antifongique ont été poursuivis dans l'optique de relier l'effet membranaire observé en microscopie et son interaction avec les glucosylcéramides du champignon.

III.5. Marquage du peptide ETD151 par un fluorophore

Afin d'élucider la localisation cellulaire du peptide et de mieux comprendre son effet membranaire, nous avons opté pour un marquage du peptide ETD151 par un fluorophore. En effet, l'association d'un peptide et d'une sonde fluorescente constitue un puissant outil dans la réalisation d'études mécanistiques basées sur l'imagerie cellulaire (Islam *et al.*, 2017). Les fluorophores sont habituellement sélectionnés sur la base de leurs propriétés spectrales. Cependant, peu d'études évaluent leur influence sur le mécanisme d'action du peptide, que ce soit sur l'interaction avec sa cible moléculaire ou sa localisation subcellulaire (Zhao *et al.*, 2016). Dans le but de suivre le peptide ETD151, nous avons privilégié le fluorophore BODIPY-FL (Lumiprobe) reconnu pour sa bonne photostabilité, son haut rendement lumineux et surtout une masse moléculaire assez faible (389 Da) en comparaison des autres sondes disponibles sur le marché. L'utilisation du BODIPY pour des études sur les défensines de plantes NaD1 et HsAFP1 (van der Weerden *et al.*, 2010 ; Cools *et al.*, 2017a) a conforté notre choix.

La stratégie de marquage adoptée a intégré la conjugaison entre la forme ester succinimidylique (NHS ester) du BODIPY et une des quatre amines primaires libres (-NH₂) du peptide ETD151 (Figure 43). Ces sites sont facilement accessibles sur la structure du peptide et ont été de ce fait favorisés par rapport aux groupes carboxyles. La réalisation et l'amélioration de la réaction de marquage, à partir d'une quantité d'ETD151 fournie par le Dr Philippe Bulet, ont été confiées à la société Genepep (Saint-Jean-de-Védas, France), spécialisée dans la synthèse chimique et l'optimisation de peptides. Moins onéreuse que la synthèse d'un nouvel échantillon du peptide ETD151 marqué sur une position spécifique, notre approche s'est révélée plus complexe pour le contrôle du site de conjugaison. L'objectif était d'obtenir une fraction ETD151-BODIPY pure et dont l'activité antifongique était équivalente à celle du peptide ETD151 natif.

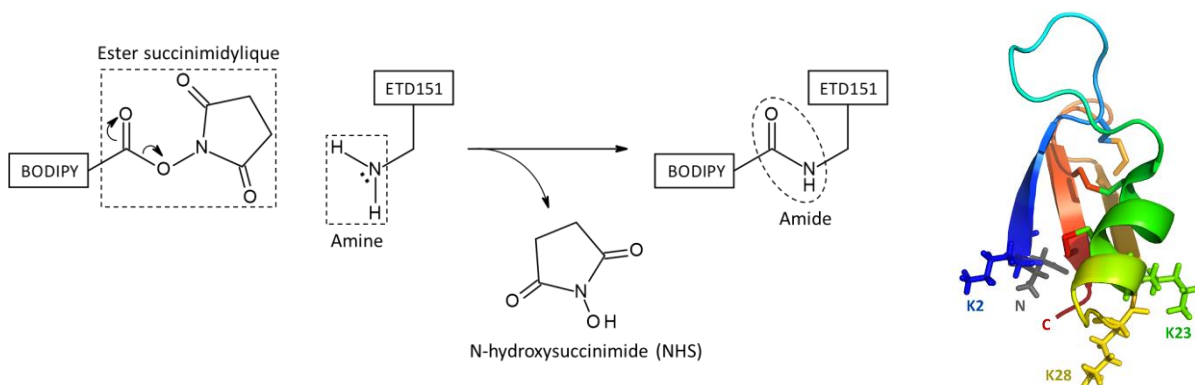


Figure 43. Conjugaison entre la forme BODIPY-FL NHS ester et la défensine ETD151

L'équation décrivant la réaction de marquage est inspirée des travaux de Rezende & Emery (2013). La séquence du peptide ETD151 comprend quatre amines primaires libres positionnées sur les lysines K2, K23, K28 et sur le résidu N-terminal. Elles sont représentées sur la structure tridimensionnelle de la défensine.

En assumant que le nombre et la position des groupes BODIPY hydrophobes couplés au peptide influent sur ses propriétés chromatographiques, sept fractions ETD151-BODIPY ont été isolées post-marquage et purifiées par chromatographie liquide (Tableau 11).

Tableau 11. Analyses des fractions obtenues après conjugaison du fluorophore BODIPY FL au peptide ETD151

Le nombre de BODIPY conjugué est identifié pour chacune des fractions par analyse élémentaire organique. La solubilité de chaque composé est évaluée après ajout de DMSO selon l'apparition ou non d'un précipité dans le fond du tube. L'activité des fractions ETD151-BODIPY est mesurée sur des spores de la souche B047 (10^4 sp/mL en milieu PDB ¼). La concentration inhibant au moins 90 % de la croissance (CI_{90}) est déterminée 7 jours après traitement.

Fractions	Masse molaire (Da)	BODIPY	Pureté	Solubilité	CI_{90} (μ M)
ETD151	4 839,46	x	100 %	+	1,56
1F1	5 387,64	2	87 %	+	6,25
1F2	5 661,73	3	95 %	-	nd
1F3	5 935,81	4	84 %	-	nd
2F1	5 113,56	1	92 %	+	1,56
2F2	5 113,56	1	85 %	+	6,25
2F3	5 387,64	2	93 %	+	6,25
2F4	5 661,73	3	84 %	-	nd

nd : non déterminé

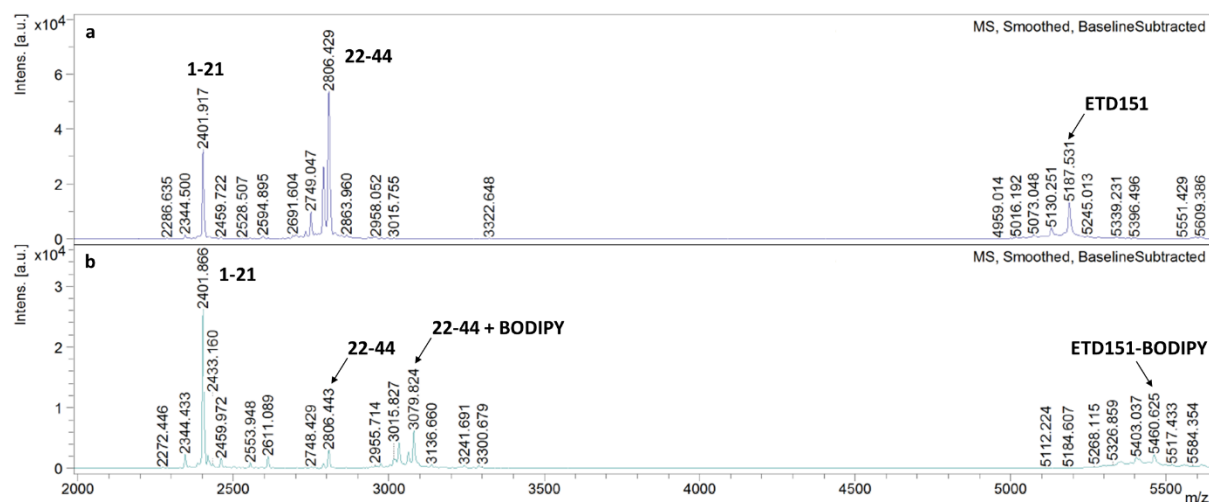
La mise en suspension des fractions dans du DMSO (0,1 % final compatible avec la culture fongique) a rapidement permis d'éliminer les fractions 1F2, 1F3 et 2F4. En effet, ces échantillons comportant au moins trois BODIPY par molécule d'ETD151 ne se sont solubilisés que dans un pourcentage élevé de phase organique. Les mesures de l'activité biologique sur des spores du champignon *B. cinerea* ont montré que seule la fraction 2F1 affichait une CI_{90} proche de la référence ETD151 pure. De ce fait, ce composé a été retenu pour la suite des travaux en microscopie confocale.

En parallèle, nous avons souhaité identifier la position du groupe BODIPY sur le peptide de la fraction 2F1. Une approche par digestion enzymatique a été mise en place pour résoudre cette question. Après réduction et alkylation des ponts disulfures, le peptide référence ETD151 et le peptide conjugué ETD151-BODIPY (2F1) ont été digérés en présence de glutamyl endopeptidase (Glu-C ou GluV8). Cette protéase clive la liaison peptidique au niveau du C-terminal des résidus acide aspartique (Asp, D), en position 1 chez le peptide ETD151, et acide glutamique (Glu, E), en positions 21 et 43 (Tableau 12). L'emplacement du groupe BODIPY a été déterminé par analyse des spectres MALDI-MS du digeste peptidique (Figure 44).

Tableau 12. Calcul des masses après digestion enzymatique des peptides ETD151 et ETD151-BODIPY

Les masses indiquées ci-dessous correspondent aux ions monochargés (MH⁺) attendus en analyse MALDI-MS. Les calculs sont basés sur la séquence et la masse moyenne du peptide ETD151 en s'aidant du site ExpASY (https://web.expasy.org/peptide_mass/) (Gasteiger *et al.*, 2005). L'alkylation par le iodoacétamide ajoute +57 par cystéine (Cys, C). La conjugaison avec le BODIPY ajoute +274 par groupe. Les résidus acides aspartique (Asp, D) et acides glutamique (Glu, E) sont colorés en rouge, les lysines (Lys, K) en bleu.

Peptide	Séquence en acides aminés	MH ⁺ (m/z)	
		Natif	+ 1 BODIPY
ETD151	D K LIGSCVWGAVNYTSNCRA E C K RRGY K GGHCGSFANVNCW C E T	5 188	5 462
1-43	D K LIGSCVWGAVNYTSNCRA E C K RRGY K GGHCGSFANVNCW C E E	5 087	5 361
1-21	D K LIGSCVWGAVNYTSNCRA E	2 401	2 675
22-44	C K RRGY K GGHCGSFANVNCW C E T	2 806	3 080
22-43	C K RRGY K GGHCGSFANVNCW C E E	2 705	2 979

**Figure 44. Analyses MALDI-MS des peptides ETD151 et ETD151-BODIPY (2F1) après digestion enzymatique**

Les spectres de masse des échantillons suivants : (a) Référence ETD151 et (b) Fraction ETD151-BODIPY (2F1) ont été générés à partir de dépôts dits « goutte séchée » de 1 µL. Les spectres ont été lissés et la ligne de base a été soustraite. L'intensité des ions, placés selon leur rapport masse/charge (m/z), est indiquée en unité arbitraire.

La comparaison des spectres ETD151 et ETD151-BODIPY (2F1) (Figure 44) a confirmé la présence d'un groupe BODIPY unique et situé dans le fragment 22-44. Afin de vérifier l'homogénéité du marquage et d'identifier la lysine concernée (K23 ou K28), deux protéases supplémentaires ont été testées pour cliver ce fragment C-terminal : la kallitréine 6 coupant préférentiellement après une arginine (Arg, R) (Li *et al.*, 2008) et l'exopeptidase leucine aminopeptidase coupant toute liaison peptidique non engagée avec un résidu proline (Pro, P). Les deux enzymes utilisées n'ont toutefois pas permis d'aboutir à une digestion complète du fragment 22-44. Compte tenu de la complexité des spectres MALDI-MS, il n'a pas été possible de différencier un marquage sur la lysine K23 ou sur la lysine K28 du peptide ETD151-BODIPY (2F1). Dénommée ETD151-BODIPY dans la suite du chapitre, la fraction 2F1 a été sélectionnée pour les travaux suivants de microscopie confocale.

III.6. Localisation subcellulaire du peptide ETD151-BODIPY

La localisation subcellulaire du peptide conjugué ETD151-BODIPY a été étudiée en microscopie confocale sur des jeunes hyphes (24 h) de *B. cinerea*. Nous avons observé une affinité immédiate du peptide pour l’enveloppe cellulaire du champignon *B. cinerea* (Figure 45a,b). Cette affinité est caractérisée par une répartition homogène du signal fluorescent le long des hyphes et au niveau des septa, riches en chitine (Mouriño-Pérez, 2013). Après 24 h de traitement, une évolution de la distribution du peptide ETD151-BODIPY a été mise en évidence, sans modification apparente de la morphologie du champignon (Figure 45c,d). La reconstitution tridimensionnelle du mycélium a confirmé l’hétérogénéité du signal fluorescent le long des hyphes, laissant apparaître des « patches » d’ETD151-BODIPY (Figure 45e). Ce type de distribution a été décrit auparavant pour la défensine de plante RsAFP2 chez la levure *C. albicans* (Thevissen *et al.*, 2012), et correspondrait à une interaction de la défensine avec les glucosylcéramides présents dans la paroi cellulaire. Dans le cas du peptide ETD151, nous avons émis deux hypothèses pour expliquer cette distribution : (i) le peptide interagirait préférentiellement avec certaines zones de l’enveloppe cellulaire riches en glucosylcéramides, créant un gradient de concentrations en ETD151-BODIPY, ou (ii) le peptide serait internalisé par le champignon, modifiant la localisation du signal fluorescent.

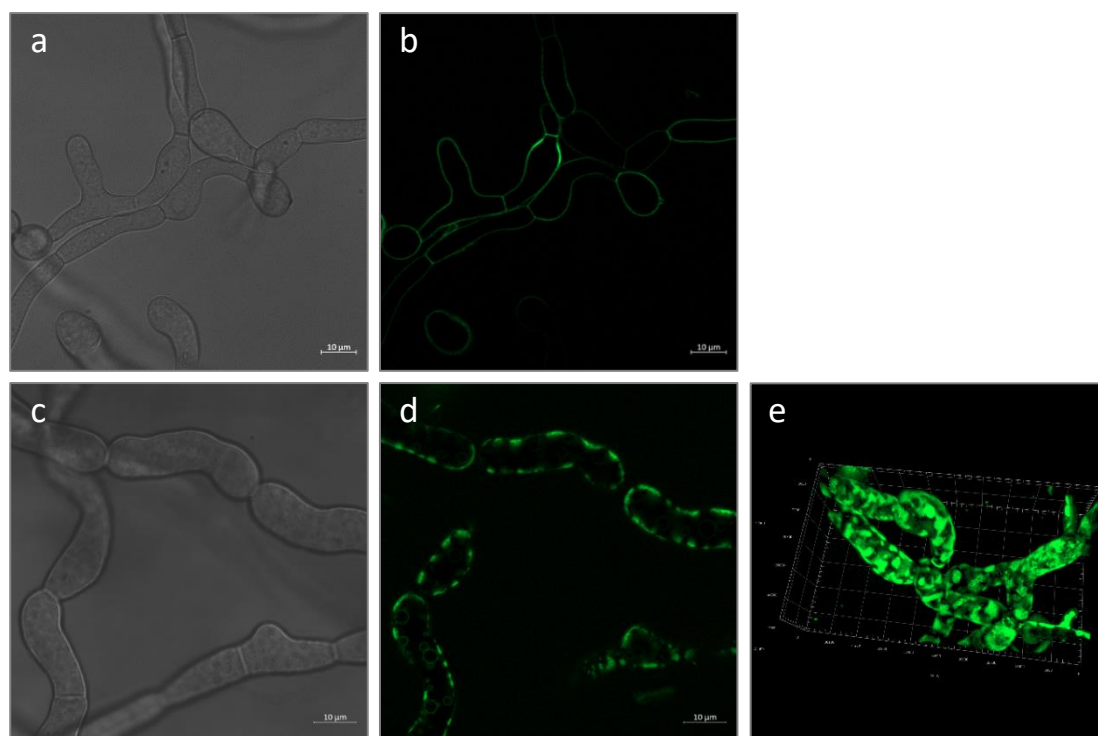


Figure 45. Localisation subcellulaire du peptide ETD151-BODIPY chez le champignon *B. cinerea*
Observations réalisées sur la souche B047 (10^4 sp/mL en milieu PDB $\frac{1}{4}$) par microscopie confocale et grossissement optique 63x. Hyphes examinés en lumière transmise et fluorescence (a, b) à T0 et (c, d) 24 h après ajout de $0,78 \mu\text{M}$ ETD151-BODIPY, respectivement. (e) Reconstitution tridimensionnelle de la structure mycélienne par assemblage d’images à différents plans focaux en présence de $0,78 \mu\text{M}$ ETD151-BODIPY à 24 h. Barre d’échelle = $10 \mu\text{m}$.

De nouvelles observations à un grossissement plus élevé (100x) ont confirmé l'existence des « patches » d'ETD151-BODIPY, dès une concentration de 0,19 μM et seulement 3 h après l'ajout du peptide (Figure 46a). Ce grossissement a également permis d'identifier pour chacune des concentrations testées (0,19, 0,39 et 0,78 μM) des vésicules intracellulaires marquées par fluorescence au niveau membranaire (Figure 46a-c, flèches). Ces vésicules sont de tailles variées, incluant notamment des vacuoles (Figure 46d, croix), et majoritairement accolées à la membrane plasmique. L'affinité du peptide ETD151-BODIPY pour la membrane de ces vésicules pourrait s'expliquer par la présence de glucosylcéramides. En effet, ces sphingolipides sont synthétisés dans l'appareil de Golgi avant leur transport par des vésicules vers la membrane plasmique (Fernandes *et al.*, 2018). Tous ces éléments suggéraient une internalisation du peptide ETD151-BODIPY par le champignon *B. cinerea* dans un délai de 2 à 3 h et indépendamment de la concentration en peptide.

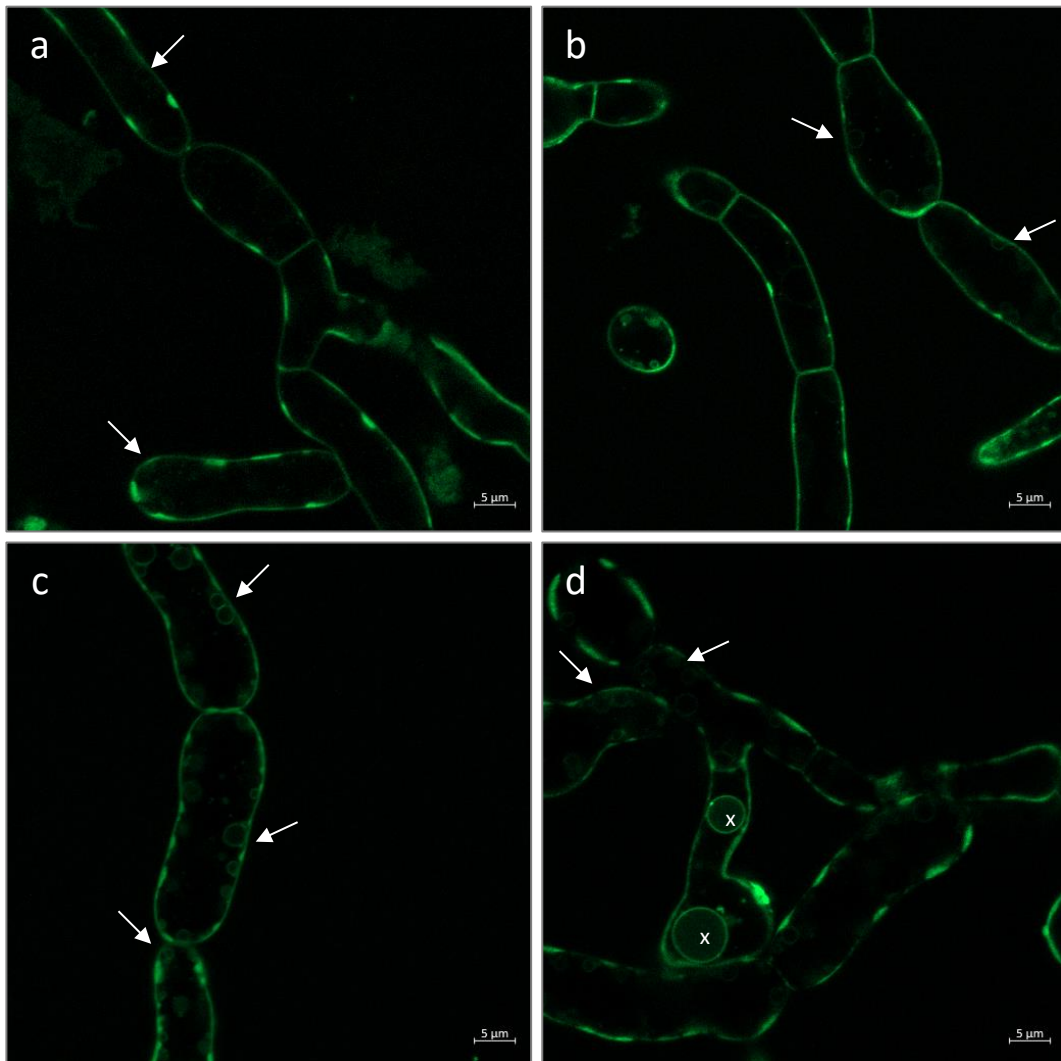


Figure 46. Internalisation du peptide ETD151-BODIPY par le champignon *B. cinerea*
Observations réalisées sur la souche B047 (10^4 sp/mL en milieu PDB $\frac{1}{4}$) par microscopie confocale et grossissement optique 100x. Hyphes examinés par fluorescence 3 h après ajout de (a) 0,19 μM , (b) 0,39 μM et (c) 0,78 μM ETD151-BODIPY. (d) Observation à 24 h pour 0,78 μM ETD151-BODIPY. Les flèches indiquent les vésicules marquées. Les vacuoles sont marquées par des croix.

Afin de suivre le processus d'internalisation du peptide ETD151-BODIPY, une vidéo « time-lapse » a été réalisée 2 h après ajout de 0,19 μM de peptide. Les vésicules sont regroupées sous la forme d'amas dans le cytosol ou au niveau de la membrane plasmique (Vidéo 3). Malgré la dynamique de ces vésicules intracellulaires, nous n'avons pas réussi à identifier un déplacement du marquage fluorescent de la membrane vers le milieu intracellulaire. Cette vidéo a toutefois permis d'observer la lyse d'un hyphe, confirmant que le marquage BODIPY n'a altéré ni l'activité du peptide ETD151, ni son mécanisme d'action.



Vidéo 3. Time-lapse en présence de 0,19 μM ETD151-BODIPY
Observation de jeunes hyphes (24 h) de la souche B047 (10^4 sp/mL en milieu PDB $\frac{1}{4}$) par microscopie confocale, 2 h après ajout de 0,19 μM ETD151-BODIPY. Mesures en fluorescence (BODIPY), à l'aide d'un grossissement optique 63x. La vidéo a été assemblée à partir de 50 images prises sur un intervalle de 10 min (5 images/s).

En parallèle des études sur son internalisation, le second objectif a été de proposer une localisation plus précise du peptide ETD151-BODIPY au niveau de l'enveloppe cellulaire. Une approche de co-marquage par le Calcofluor (chitine dans la paroi) et le FM4-64 (membrane et endocytose) a été mise en place sur des hyphes du champignon *B. cinerea* et à un grossissement élevé (100x) (Figure 47).

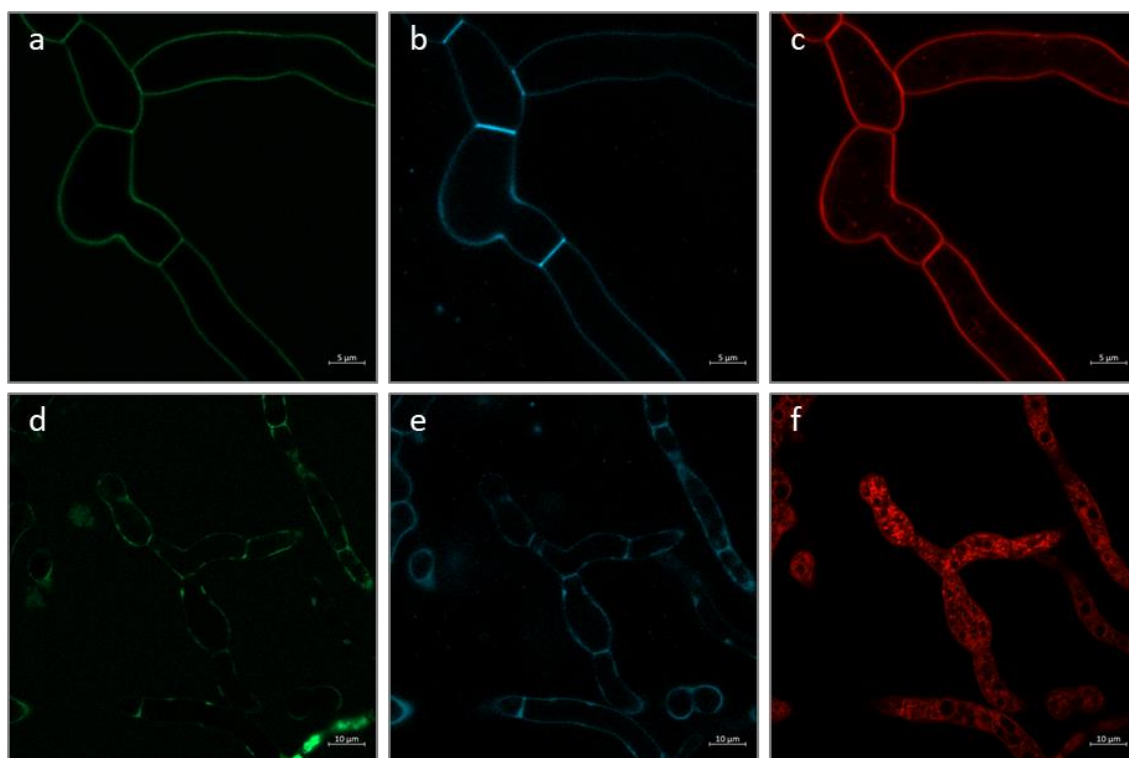


Figure 47. Localisation du peptide ETD151-BODIPY sur les hyphes du champignon *B. cinerea*

Observations réalisées sur la souche B047 (10^4 sp/mL en milieu PDB $\frac{1}{4}$) par microscopie confocale et grossissement optique 100x. Hyphes examinés par co-marquage (a-c) 30 min et (d-f) 24 h en présence de 0,19 μM ETD151-BODIPY (vert), Calcofluor (bleu) et FM4-64 (rouge), respectivement.

La paroi cellulaire et la membrane plasmique du champignon *B. cinerea* ont été marquées avec succès par le Calcofluor et le FM4-64 (Figure 47b,c). Cependant, un grossissement optique 100x n'a pas été suffisant pour les discriminer et localiser précisément le peptide ETD151-BODIPY (Figure 47a). L'utilisation d'un zoom numérique additionnel pourrait résoudre ce point.

La distribution sous forme de « patches » du peptide ETD151-BODIPY a été confirmée à 24 h après l'ajout d'une concentration de 0,19 μM (Figure 47d). De manière intéressante, la distribution du marquage Calcofluor a montré d'importantes similarités avec celle du peptide, au contraire du marquage FM4-64 (Figure 47e,f). Ce résultat suggérerait un effet du peptide ETD151 sur la paroi cellulaire en adéquation avec l'impact sur la voie CWI démontré lors des études protéomiques différentielles. Il sera nécessaire de répéter cette étude pour conclure sur cette observation.

Conclusion

Le phénotypage du champignon *B. cinerea* en présence du peptide ETD151 a apporté de nouveaux éléments dans la compréhension de son mécanisme d'action. La germination des spores et l'élongation des tubes germinatifs sont inhibées dès une concentration de 0,19 μM . Parallèlement, nous avons observé une perturbation de l'intégrité membranaire avec un phénomène de lyse au niveau du bouton germinatif des spores et aux extrémités apicales des hyphes. La lyse aboutit à la libération du contenu cytoplasmique et à une croissance anarchique du mycélium (hyper-ramification). L'ensemble de ces modifications morphologiques a permis de classer le peptide ETD151 parmi les défensines morphogéniques, à l'instar de la drosomycine, de l'héliomicine et de plusieurs défensines de plantes. De plus, nous avons démontré que le peptide ETD151 n'interagissait pas avec la voie HOG. Le marquage du peptide par le fluorophore BODIPY a été réalisé avec succès, la fraction 2F1 conservant l'activité biologique de l'ETD151 natif. Le peptide ETD151-BODIPY nous a permis de mettre en évidence, dès une concentration de 0,19 μM , sa localisation au niveau de l'enveloppe cellulaire de *B. cinerea*, son internalisation par le champignon dans un délai de 2 à 3 h (dans des conditions de non-lyse) et son affinité avec la membrane de vésicules intracellulaires.

À ce stade des travaux, de nombreuses questions restent toutefois en suspens. La localisation précise du peptide ETD151-BODIPY pourrait être déterminée en microscopie confocale en continuant le co-marquage Calcofluor/FM4-64 ou en utilisant la filipine, marqueur du stérol dans les radeaux lipidiques riches en glucosylcéramides (GlcCer) (Fernandes *et al.*, 2016).

La relation entre l'interaction ETD151-GlcCer et les effets membranaires observés n'a pas pu être établie pour le moment. Afin de résoudre ce point, le comportement du peptide ETD151-BODIPY pourrait être étudié en microscopie confocale sur des espèces dépourvues de glucosylcéramides : la levure *Saccharomyces cerevisiae* ou des mutants Δgcs de levures et du champignon *B. cinerea*.

Dans l'objectif de résoudre le mécanisme d'internalisation du peptide ETD151-BODIPY, une étude cinétique de co-marquage avec le FM4-64 (marqueur de l'endocytose) pourrait être mise en place. Des essais de photoblanchissement ou « bleaching » apporteraient également des éléments de réponse. Le signal fluorescent ETD151-BODIPY serait supprimé par une importante excitation lumineuse avant d'observer les zones où celui-ci réapparaîtrait.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux pluridisciplinaires réalisés au cours de cette thèse permettent aujourd'hui de proposer une hypothèse de mécanisme d'action pour le peptide antifongique ETD151 sur le champignon *Botrytis cinerea* (Figure 48).

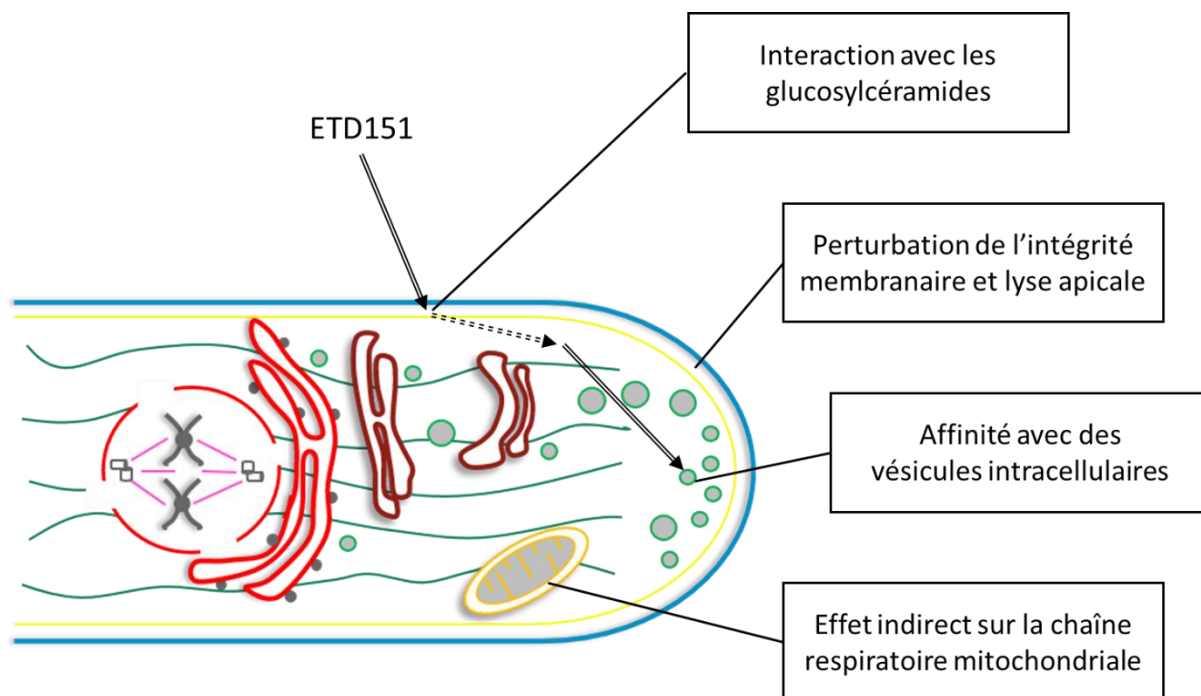


Figure 48. Proposition de mécanisme d'action pour le peptide ETD151 sur le champignon *B. cinerea*

Le peptide ETD151 interagirait avec les glucosylcéramides présents dans la membrane. Il serait ensuite internalisé par le champignon selon un mécanisme restant à résoudre. Le peptide présenterait une affinité pour la membrane de vésicules intracellulaires. Parallèlement à son internalisation, l'activité du peptide incluerait une perturbation de l'intégrité membranaire, un phénomène de lyse apicale et un effet indirect sur la chaîne respiratoire mitochondriale.

Dans un premier temps, le peptide ETD151 interagirait avec les glucosylcéramides, partenaires lipidiques présents dans la membrane de nombreuses levures et champignons filamenteux. C'est notamment le cas du champignon *B. cinerea* pour lequel trois de ces sphingolipides ont été identifiés par spectrométrie de masse : *Bc-GlcCer-1*, *Bc-GlcCer-2* (d18:2/h16:1) et *Bc-GlcCer-3* (d18:2/h16:0). Les glucosylcéramides seraient nécessaires à l'action du peptide antifongique comme l'a démontré l'absence d'activité sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* ou sur les mutants Δgcs de *Candida albicans* et *Pichia pastoris*. L'évaluation sur un mutant Δgcs de *B. cinerea* permettrait de confirmer totalement ce point. La réalisation de nouvelles analyses sur des extraits lipidiques membranaires de *B. cinerea* apporterait une importante plus-value aux données déjà acquises. Il serait possible d'affiner la structure des composés *Bc-GlcCer-1* et *Bc-GlcCer-2*, de purifier le composé *Bc-GlcCer-3* et également d'élargir l'identification à d'autres lipides membranaires de *B. cinerea*. En effet, la littérature est encore aujourd'hui très pauvre dans ce domaine.

Dans un second temps, nous avons observé par microscopie confocale que le peptide ETD151, marqué par le fluorophore BODIPY, était internalisé par le champignon *B. cinerea*, selon un mécanisme restant à résoudre. Il présenterait par la suite une affinité particulière pour la membrane de vésicules intracellulaires. Parmi les défensines antifongiques de plantes, deux scénarios sont principalement retenus pour expliquer l'entrée des peptides dans le cytoplasme : le processus énergétiquement dépendant de l'endocytose (NaD1, HsAFP1, MtDef4) ou un transport passif énergétiquement indépendant (MtDef4). Disposant du peptide marqué ETD151-BODIPY, les travaux de microscopie pourraient se poursuivre sur la cinétique d'internalisation du peptide et sa colocalisation avec le marqueur d'endocytose FM4-64 (Fischer-Parton *et al.*, 2000). Nous pourrions également évaluer l'entrée du peptide ETD151 en présence de différents inhibiteurs de l'endocytose tels que la filipine (inhibiteur de l'endocytose dépendante des radeaux lipidiques), l'azoture de sodium (inhibiteur de la production d'ATP), la cytochalasine D (inhibiteur de polymérisation de l'actine) ou la brefeldine A (inhibiteur de la voie sécrétoire réticulum endoplasmique vers Golgi) (El-Mounadi *et al.*, 2016). Également utilisée pour le marquage fluorescent des radeaux lipidiques (Fernandes *et al.*, 2016), la filipine permettrait de mesurer la colocalisation du peptide ETD151-BODIPY avec les glucosylcéramides présents dans la membrane du champignon *B. cinerea*. De façon intéressante, l'endocytose et le traitement des protéines dans le réticulum endoplasmique ont été deux des voies mises en avant chez *B. cinerea* dans les études protéomiques différentielles en présence du peptide ETD151.

Dans un troisième temps, nous avons montré que le peptide antifongique induisait un ensemble de modifications morphologiques sur le champignon *B. cinerea*. Au cours de ce travail, nous avons notamment mis en lumière des perturbations de l'intégrité membranaire avec lyse aux extrémités apicales, des pertes du contenu cytoplasmique et une hyper-ramification des hyphes. Ces observations ont pu être corrélées avec les données protéomiques obtenues en amont chez *B. cinerea*, démontrant un impact de ETD151 sur la voie impliquée dans l'intégrité de la paroi cellulaire (Cell Wall Integrity). Il conviendrait par la suite d'évaluer l'activité du peptide en conditions d'équilibre ou de stress salin (NaCl), pariétal (Calcoflor) ou osmotique (sorbitol) (Zhu *et al.*, 2017). Des études de synergie avec la nikkomycine Z (inhibiteur de la biosynthèse de la chitine) et la caspofungine (inhibiteur de la biosynthèse des β -glucanes) permettraient également de révéler un effet direct du peptide ETD151 sur la synthèse de ces deux composants de la paroi cellulaire fongique (Galland, 2013).

Les modifications morphologiques observées pourraient découler indirectement de l'interaction du peptide avec les glucosylcéramides de *B. cinerea*, entraînant des perturbations dans les radeaux lipidiques membranaires. À l'image de la défensine RsAFP2 (Thevissen *et al.*, 2012), le peptide ETD151 pourrait également interagir avec des glucosylcéramides présents dans la paroi cellulaire, aboutissant à l'activation de la voie CWI, à l'augmentation des niveaux de céramide membranaire et à une apoptose .

Dans ces travaux de thèse, la protéomique a été une approche innovante et a apporté des éléments de compréhension concernant l'impact moléculaire du peptide ETD151 sur le champignon *B. cinerea*. À partir d'extraits mycéliens analysés en MALDI-MS, des empreintes peptidiques caractéristiques ont été générées sur une gamme de masse de 600 Da à 18 kDa, en absence ou présence de différentes concentrations du peptide ETD151. Les spectres ont traduit des modifications de la composition peptidique de notre champignon liées à l'activité antifongique du peptide. Ces résultats ont ouvert la voie à l'analyse des extraits mycéliens digérés par LC-ESI-MS/MS bottom-up sur une gamme de masse plus importante, 4,8 à 466 kDa. Le design expérimental mis en place a permis d'obtenir des données reproductibles compatibles avec une analyse statistique différentielle. Une sélection de 340 protéines significativement modulées en présence de ETD151 a été réalisée, dont 106 ont été placées avec succès sur les voies métaboliques du champignon *B. cinerea*. Six de ces voies ont été mises en lumière dont l'endocytose, le réticulum endoplasmique, la voie de signalisation MAP kinases citées précédemment mais également les ribosomes, le spliceosome et la chaîne respiratoire des mitochondries. Des tests d'activité sur les complexes mitochondriaux I, II et III ont démontré que cette voie était touchée indirectement par le peptide ETD151.

Aujourd'hui, la protéomique est sans doute une approche trop lourde expérimentalement pour être implantée en routine lors du diagnostic du mécanisme d'action d'une molécule, tel qu'on peut le trouver dans la recherche et le développement industriel. Sur le long terme, il serait cependant intéressant de comparer les données MALDI-MS et LC-ESI-MS/MS obtenues pour le peptide ETD151 sur le champignon *B. cinerea* à d'autres solutions antifongiques, défensines ou petites molécules, et dont le mécanisme d'action est connu. Additionnellement, les analyses MALDI-MS seraient susceptibles de proposer une alternative à la microscopie dans l'étude de l'internalisation du peptide ETD151. Nous pourrions tenter d'identifier ETD151 dans des extraits ciblés du contenu cytoplasmique et des organites intracellulaires du champignon *B. cinerea*.

Repositionnés dans le domaine des défensines CS $\alpha\beta$, ces travaux de thèse constituent la première proposition de mécanisme d'action pour une défensine d'insecte antifongique (Figure 48). Au-delà de partager un motif structural (CS $\alpha\beta$), une homologie évolutionnelle (superfamille cis) et des fonctions communes (activité antifongique), les défensines de plantes et d'insectes proposeraient des mécanismes d'action similaires. D'après la classification des défensines de plantes proposée par Cools *et al.* (2017b) selon leur partenaire membranaire, le peptide ETD151 appartiendrait au même groupe que les défensines MsDef1, RsAFP2 et Psd1, toutes interagissant avec les glucosylcéramides. Tout comme ETD151, MsDef1 et RsAFP2 sont des défensines morphogéniques inhibant la croissance des espèces fongiques, altérant la perméabilité membranaire et entraînant une hyper-ramification des hyphes. Elles activent également la voie impliquée dans l'intégrité de la paroi cellulaire (CWI). Toutefois, MsDef1 et RsAFP2 ne sont pas internalisées par les champignons ou les levures au contraire de la défensine Psd1, qui interagit avec la cycline F dans le noyau du champignon *Neurospora crassa* (Lobo *et al.*, 2007). Les données disponibles sur ces trois défensines de plantes sont une source d'inspiration pour la poursuite des travaux sur le peptide ETD151, et permettront de continuer à évaluer les similarités ou disparités dans leurs mécanismes d'action antifongique. Par exemple, la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par le peptide ETD151 chez *B. cinerea* devrait être évaluée, le stress induit par les ROS entraînant une mort cellulaire programmée ou une apoptose des cellules fongiques. Des essais préliminaires ont été initiés afin de transposer le protocole mis au point par Aerts *et al.* (2007) de *C. albicans* à *B. cinerea*, mais ils n'ont pas donné de résultats probants.

Parmi les approches pluridisciplinaires envisagées au début de la thèse, il était question de tester le peptide ETD151 sur une banque de mutants de *B. cinerea*. Cet outil nécessitant encore du développement, une alternative par mutagenèse UV a été testée en fin de thèse à l'image des travaux de Mosbach *et al.* (2017). La volonté était de sélectionner des souches hyper sensibles ou résistantes à ETD151 afin d'identifier après séquençage des gènes impliqués dans le mécanisme d'action du peptide antifongique. Malgré plusieurs milieux solides testés, aucune concentration de sélection n'a pu être identifiée pour ETD151 compromettant ainsi cette étude. Le peptide étant incorporé au milieu, il se pourrait que ses propriétés migratoires différentes d'une petite molécule aient réduit son efficacité sur les spores de *B. cinerea*. Une réduction de la concentration en agar dans le milieu serait une possible solution pour conduire la mutagenèse UV.

Les champignons phytopathogènes ciblant principalement les cultures, les défensines antifongiques de plantes et d'insectes ont été utilisées pour des applications phytosanitaires, telles que la préparation de plantes transgéniques (Banzet *et al.*, 2002 ; Lacerda *et al.*, 2014). Cependant, dans le cadre du développement de nouvelles solutions antifongiques, le peptide ETD151 présente les mêmes limites que nombreux peptides antimicrobiens : le coût de production. Malgré une forte activité biologique, l'absence de toxicité et l'existence de moyens de production hétérologue, il est nécessaire de réduire la structure du peptide. Les études de l'interaction au niveau atomique entre ETD151 et les glucosylcéramides devraient mettre en évidence les sites essentiels pour le peptide. Ces données seront utilisées pour créer une librairie de peptides de taille réduite (< 5 kDa) et vérifier la conservation de l'activité antifongique par rapport au peptide ETD151 natif. Ces candidats pourront être criblés *in vitro* et *in planta* sur différents champignons phytopathogènes, y compris *B. cinerea*. Le peptide actif le plus adapté sera associé à une formulation appropriée au contrôle des maladies des plantes d'intérêt.

Les découvertes concernant le mécanisme d'action du peptide ETD151, incluant l'identification de son partenaire membranaire, pourront être exploitées pour le marché des petites molécules ou autres substances antifongiques. De plus, la littérature propose de nombreuses études elucidant le rôle des glucosylcéramides chez les champignons, tel que la régulation de la virulence (Poeta *et al.*, 2014). Cependant, la recherche actuelle favorise les composés ciblant la biosynthèse des sphingolipides, soit une cible enzymatique comme le gène *GCS*, au dépend de molécules ciblant directement les glucosylcéramides, proposant pourtant un faible risque de résistances (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2016). Le développement des peptides antimicrobiens pour des applications phytosanitaires est donc fortement dépendant de la conjecture scientifique, de la stratégie des entreprises et du contexte économique et social. Le potentiel des défensines comme ETD151 ne demande qu'à être exploité et dépendra des investissements futurs dans ce secteur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achstetter, T., Nguyen-Juilleret, M., Findeli, A., Merkamm, M., & Lemoine, Y. (1992). A new signal peptide useful for secretion of heterologous proteins from yeast and its application for synthesis of hirudin. *Gene*, *110*(1), 25-31. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90440-Z](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90440-Z)
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., ... Taylor, M. F. J. R. (2005). The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *52*(5), 399-451. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>
- Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Meert, E. M. K., Li, Q.-T., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2007). The Antifungal Activity of RsAFP2, a Plant Defensin from *Raphanus sativus*, Involves the Induction of Reactive Oxygen Species in *Candida albicans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *13*(4), 243-247. <https://doi.org/10.1159/000104753>
- Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2008). The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*(13), 2069-2079. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8035-0>
- Aerts, A. M., Carmona-Gutierrez, D., Lefevre, S., Govaert, G., François, I. E. J. A., Madeo, F., ... Thevissen, K. (2009). The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. *FEBS Letters*, *583*(15), 2513-2516. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.004>
- Aerts, A. M., Bammens, L., Govaert, G., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2011). The Antifungal Plant Defensin HsAFP1 from *Heuchera sanguinea* Induces Apoptosis in *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, *2*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00047>
- Agrios, G. (2005). *Plant pathology: Fifth edition* (Vol. 9780080473789). Elsevier. Consulté à l'adresse <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20090020376>
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(12), 5301-5317. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>
- Almagro Armenteros, J. J., Sønderby, C. K., Sønderby, S. K., Nielsen, H., & Winther, O. (2017). DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics*, *33*(21), 3387-3395. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx431>
- Almeida, M. S., Cabral, K. M. S., Zingali, R. B., & Kurtenbach, E. (2000). Characterization of Two Novel Defense Peptides from Pea (*Pisum sativum*) Seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *378*(2), 278-286. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1824>
- Almeida, M. S., Cabral, K. M. S., Kurtenbach, E., Almeida, F. C. L., & Valente, A. P. (2002). Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. *Journal of Molecular Biology*, *315*(4), 749-757. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5252>
- Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A. L., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., ... Dickman, M. (2011). Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLOS Genetics*, *7*(8), e1002230. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002230>
- Anderson, F. T. L. and M. A. (2005, janvier 31). Defensins - Components of the Innate Immune System in Plants. Consulté 19 mars 2019, à l'adresse <http://www.eurekaselect.com/79064/article>
- Andrès, E. (2012). Cationic antimicrobial peptides in clinical development, with special focus on thanatin and heliomycin. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *31*(6), 881-888. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1430-8>
- Andrès, E., & Dimarcq, J.-L. (2004). Cationic anti-microbial peptides: from innate immunity study to drug development. *La Revue de Médecine Interne*, *25*(9), 629-635. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2004.02.025>
- Aouida, M., Leduc, A., Poulin, R., & Ramotar, D. (2005). AGP2 Encodes the Major Permease for High Affinity Polyamine Import in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(25), 24267-24276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503071200>

- Banzet, N., Latorse, M.-P., Bulet, P., François, E., Derpierre, C., & Dubald, M. (2002). Expression of insect cystein-rich antifungal peptides in transgenic tobacco enhances resistance to a fungal disease. *Plant Science*, *162*(6), 995-1006. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00053-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00053-5)
- Barreto-Bergter, E., Pinto, M. R., & Rodrigues, M. L. (2004). Structure and biological functions of fungal cerebrosides. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *76*(1), 67-84. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652004000100007>
- Barreto-Bergter, E., Sasaki, G. L., & Souza, L. (2011). Structural Analysis of Fungal Cerebrosides. *Frontiers in Microbiology*, *2*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00239>
- Bauer, F., Schweimer, K., Klüver, E., Conejo-Garcia, J.-R., Forssmann, W.-G., Rösch, P., ... Sticht, H. (2001). Structure determination of human and murine β -defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Science*, *10*(12), 2470-2479. <https://doi.org/10.1110/ps.24401>
- Beever, R. E., & Weeds, P. L. (2007). Taxonomy and Genetic Variation of Botrytis and Botryotinia. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (p. 29-52). Consulté à l'adresse https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-2626-3_3
- Bensch, K. W., Raida, M., Mägert, H.-J., Schulz-Knappe, P., & Forssmann, W.-G. (1995). hBD-1: a novel β -defensin from human plasma. *FEBS Letters*, *368*(2), 331-335. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00687-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00687-5)
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 235-242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Birch, P. R. J., & Whisson, S. C. (2001). Phytophthora infestans enters the genomics era. *Molecular Plant Pathology*, *2*(5), 257-263. <https://doi.org/10.1046/j.1464-6722.2001.00073.x>
- Bleackley, M. R., Wiltshire, J. L., Perrine-Walker, F., Vasa, S., Burns, R. L., van der Weerden, N. L., & Anderson, M. A. (2014). Agp2p, the Plasma Membrane Transregulator of Polyamine Uptake, Regulates the Antifungal Activities of the Plant Defensin NaD1 and Other Cationic Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(5), 2688-2698. <https://doi.org/10.1128/AAC.02087-13>
- Bleackley, M. R., Payne, J. A. E., Hayes, B. M. E., Durek, T., Craik, D. J., Shafee, T. M. A., ... Anderson, M. A. (2016). Nicotiana alata Defensin Chimeras Reveal Differences in the Mechanism of Fungal and Tumor Cell Killing and an Enhanced Antifungal Variant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(10), 6302-6312. <https://doi.org/10.1128/AAC.01479-16>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., ... Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, *2*(2), 95-113. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(77\)90000-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(77)90000-2)
- Boman, H. G. (1995). Peptide Antibiotics and Their Role in Innate Immunity. *Annual Review of Immunology*, *13*(1), 61-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.000425>
- Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Menez, A., & Toma, F. (1991). Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. *Science*, *254*(5037), 1521-1523. <https://doi.org/10.1126/science.1720574>
- Broekaert, W. F., Terras, F., Cammue, B., & Osborn, R. W. (1995). Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System. *Plant Physiology*, *108*(4), 1353-1358. <https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1353>
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine*, *4*(165), 165rv13-165rv13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>
- Brown, K. L., & Hancock, R. E. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*, *18*(1), 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.004>

- Brügger, B. (2014). Lipidomics: Analysis of the Lipid Composition of Cells and Subcellular Organelles by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*, 83(1), 79-98. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035324>
- Bruix, M., Jimenez, M. A., Santoro, J., Gonzalez, C., Colilla, F. J., Mendez, E., & Rico, M. (1993). Solution structure of γ -1-H and γ -1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by proton NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry*, 32(2), 715-724. <https://doi.org/10.1021/bi00053a041>
- Bulet, P., Stöcklin, R., & Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 198(1), 169-184. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x>
- Bulet, P., & Stöcklin, R. (2005). Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters*, 12(1), 3-11.
- Burley, S. K., Berman, H. M., Bhikadiya, C., Bi, C., Chen, L., Di Costanzo, L., ... Zardecki, C. (2019). RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D464-D474. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1004>
- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., ... Tudzynski, P. (1994). Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics*, 25(5), 445-450. <https://doi.org/10.1007/BF00351784>
- Calixto, R. O. R., Rollin-Pinheiro, R., da Silva, M. I. D., Liporagi-Lopes, L. C., Vieira, J. M., Sasaki, G. L., & Barreto-Bergter, E. (2016). Structural analysis of glucosylceramides (GlcCer) from species of the *Pseudallescheria/Scedosporium* complex. *Fungal Biology*, 120(2), 166-172. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.05.007>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Cammue, B. P., Bolle, M. F. D., Terras, F. R., Proost, P., Damme, J. V., Rees, S. B., ... Broekaert, W. F. (1992). Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 267(4), 2228-2233.
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., & Madeo, F. (2010). Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death and Differentiation*, 17(5), 763-773. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.219>
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.-M., Simon, A., & Viaud, M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 277(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00930.x>
- Clarke, N. G., & Dawson, R. M. C. (1981). Alkaline O \rightarrow N-transacylation. A new method for the quantitative deacylation of phospholipids. *Biochemical Journal*, 195(1), 301-306. <https://doi.org/10.1042/bj1950301>
- Colilla, F. J., Rocher, A., & Mendez, E. (1990). γ -Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Letters*, 270(1-2), 191-194. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81265-P](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81265-P)
- Cools, T. L., Vriens, K., Struyfs, C., Verbandt, S., Ramada, M. H. S., Brand, G. D., ... Thevissen, K. (2017a). The Antifungal Plant Defensin HsAFP1 Is a Phosphatidic Acid-Interacting Peptide Inducing Membrane Permeabilization. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02295>
- Cools, T. L., Struyfs, C., Cammue, B. P., & Thevissen, K. (2017b). Antifungal plant defensins: increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. *Future Microbiology*, 12(5), 441-454. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0181>
- Cornet, B., Bonmatin, J.-M., Hetru, C., Hoffmann, J. A., Ptak, M., & Vovelle, F. (1995). Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure*, 3(5), 435-448. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00177-0)

- Corran, A., Knauf-Beiter, G., & Zeun, R. (2012). Fungicides Acting on Signal Transduction. In *Modern Crop Protection Compounds* (p. 715-737). John Wiley & Sons, Ltd. Consulté à l'adresse <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527644179.ch17>
- Cui, W., Beever, R. E., Parkes, S. L., Weeds, P. L., & Templeton, M. D. (2002). An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Fungal Genetics and Biology*, 36(3), 187-198. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00009-9](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00009-9)
- Cytryńska, M., Mak, P., Zdybicka-Barabas, A., Suder, P., & Jakubowicz, T. (2007). Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides*, 28(3), 533-546. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.11.010>
- Daly, N. L., Chen, Y.-K., Rosengren, K. J., Marx, U. C., Phillips, M. L., Waring, A. J., ... Craik, D. J. (2007). Retrocyclin-2: Structural Analysis of a Potent Anti-HIV θ -Defensin. *Biochemistry*, 46(35), 9920-9928. <https://doi.org/10.1021/bi700720e>
- Dash, T. S., Shafee, T., Harvey, P. J., Zhang, C., Peigneur, S., Deuis, J. R., ... Undheim, E. A. B. (2019). A Centipede Toxin Family Defines an Ancient Class of CS α Defensins. *Structure*, 27(2), 315-326.e7. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.10.022>
- De Coninck, B., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2013). Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biology Reviews*, 26(4), 109-120. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.10.002>
- de Medeiros, L. N., Angeli, R., Sarzedas, C. G., Barreto-Bergter, E., Valente, A. P., Kurtenbach, E., & Almeida, F. C. L. (2010). Backbone dynamics of the antifungal Psd1 pea defensin and its correlation with membrane interaction by NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1798(2), 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.07.013>
- de Medeiros, L. N., Domitrovic, T., Andrade, P. C. de, Faria, J., Bergter, E. B., Weissmüller, G., & Kurtenbach, E. (2014). Psd1 binding affinity toward fungal membrane components as assessed by SPR: The role of glucosylceramide in fungal recognition and entry. *Peptide Science*, 102(6), 456-464. <https://doi.org/10.1002/bip.22570>
- de Oliveira Carvalho, A., & Moreira Gomes, V. (2011). Plant Defensins and Defensin-Like Peptides - Biological Activities and Biotechnological Applications. *Current Pharmaceutical Design*, 17(38), 4270-4293. <https://doi.org/10.2174/138161211798999447>
- de Souza Cândido, E., e Silva Cardoso, M. H., Sousa, D. A., Viana, J. C., de Oliveira-Júnior, N. G., Miranda, V., & Franco, O. L. (2014). The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. *Peptides*, 55, 65-78. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.02.003>
- Dean, R., van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Pietro, A. D., Spanu, P. D., ... Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W. L., & Bevins, C. L. (1991). Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(9), 3952-3956. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3952>
- Dias, R. de O., & Franco, O. L. (2015). Cysteine-stabilized $\alpha\beta$ defensins: From a common fold to antibacterial activity. *Peptides*, 72, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.017>
- Dickson, R. C., Nagiec, E. E., Wells, G. B., Nagiec, M. M., & Lester, R. L. (1997). Synthesis of Mannose-(inositol-P)2-ceramide, the Major Sphingolipid in *Saccharomyces cerevisiae*, Requires the IPT1 (YDR072c) Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 272(47), 29620-29625. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.47.29620>
- Dimarcq, J.-L., Legrain, M., & Menin, L. (2003). *US20030208035A1*. United States. Consulté à l'adresse <https://patents.google.com/patent/US20030208035A1/en?q=dimarcq&oq=dimarcq>
- Dohmen, R. J., Strasser, A. W. M., Höner, C. B., & Hollenberg, C. P. (1991). An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast*, 7(7), 691-692. <https://doi.org/10.1002/yea.320070704>

- Doss, R. P. (1999). Composition and Enzymatic Activity of the Extracellular Matrix Secreted by Germlings of *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *65*(2), 404-408.
- Duarte, R. S., Polycarpo, C. R., Wait, R., Hartmann, R., & Barreto Bergter, E. (1998). Structural characterization of neutral glycosphingolipids from *Fusarium* species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *1390*(2), 186-196. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(97\)00179-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(97)00179-3)
- Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Büttner, S., Tavernarakis, N., & Madeo, F. (2010). Necrosis in yeast. *Apoptosis*, *15*(3), 257-268. <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0453-4>
- Elad, Y., Vivier, M., & Fillinger, S. (2016). Botrytis, the Good, the Bad and the Ugly. In *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (p. 1-15). Consulté à l'adresse https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-23371-0_1
- Elad, Y., & Pertot, I. (2014). Climate Change Impacts on Plant Pathogens and Plant Diseases. *Journal of Crop Improvement*, *28*(1), 99-139. <https://doi.org/10.1080/15427528.2014.865412>
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., ... Finn, R. D. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D427-D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>
- El-Mounadi, K., Islam, K. T., Hernández-Ortiz, P., Read, N. D., & Shah, D. M. (2016). Antifungal mechanisms of a plant defensin MtDef4 are not conserved between the ascomycete fungi *Neurospora crassa* and *Fusarium graminearum*. *Molecular Microbiology*, *100*(3), 542-559. <https://doi.org/10.1111/mmi.13333>
- European Commission. (2018, mars). Public Consultation on the REFIT evaluation of the EU legislation on plant protection products and pesticide residues. Consulté à l'adresse https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_ppp_refit_survey-2017_sum.pdf
- Eurostat. (2018, octobre 15). Sales of pesticides in the EU. Consulté 23 octobre 2018, à l'adresse <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/DDN-20181015-1>
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W. F., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (1994). Insect immunity: Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(52), 33159-33163.
- Ferket, K. K. A., Levery, S. B., Park, C., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2003). Isolation and characterization of *Neurospora crassa* mutants resistant to antifungal plant defensins. *Fungal Genetics and Biology*, *40*(2), 176-185. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(03\)00085-9](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(03)00085-9)
- Fernandes, C. M., Castro, P. A. de, Singh, A., Fonseca, F. L., Pereira, M. D., Vila, T. V. M., ... Kurtenbach, E. (2016). Functional characterization of the *Aspergillus nidulans* glucosylceramide pathway reveals that LCB $\Delta 8$ -desaturation and C9-methylation are relevant to filamentous growth, lipid raft localization and Psd1 defensin activity. *Molecular Microbiology*, *102*(3), 488-505. <https://doi.org/10.1111/mmi.13474>
- Fernandes, C. M., Goldman, G. H., & Poeta, M. D. (2018). Biological Roles Played by Sphingolipids in Dimorphic and Filamentous Fungi. *MBio*, *9*(3), e00642-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00642-18>
- Fillinger, S., & Walker, A.-S. (2016). Chemical Control and Resistance Management of Botrytis Diseases. In *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (p. 189-216). Consulté à l'adresse https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-23371-0_10
- Fischer-Parton, S., Parton, R. M., Hickey, P. C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H. A., & Read, N. D. (2000). Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *Journal of Microscopy*, *198*(3), 246-259. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00708.x>
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, *484*(7393), 186-194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- FRAC. (2018). Poster: Mode of Action of Fungicides. Consulté à l'adresse http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-mode-of-action-poster/frac-moa-poster-2018.pdf?sfvrsn=505b4b9a_2

- Galland, E. (2013). *Étude de la biosynthèse de la chitine et du β -(1,3)-glucane chez Botrytis cinerea : application à de nouvelles stratégies antifongiques* (thesis). Lyon 1. Consulté à l'adresse <http://www.theses.fr/2013LYO10075>
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 710-720. <https://doi.org/10.1038/nri1180>
- Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F., & Lehrer, R. I. (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, 76(4), 1427-1435. <https://doi.org/10.1172/JCI112120>
- Gao, A.-G., Hakimi, S. M., Mittanck, C. A., Wu, Y., Woerner, B. M., Stark, D. M., ... Rommens, C. M. T. (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology*, 18(12), 1307-1310. <https://doi.org/10.1038/82436>
- Gao, B., & Zhu, S.-Y. (2008). Differential potency of drosomycin to *Neurospora crassa* and its mutant: implications for evolutionary relationship between defensins from insects and plants. *Insect Molecular Biology*, 17(4), 405-411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2008.00810.x>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker (Éd.), *The Proteomics Protocols Handbook* (p. 571-607). Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Gatignol, A., Dassain, M., & Tiraby, G. (1990). Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* promoters using a probe vector based on phleomycin resistance. *Gene*, 91(1), 35-41. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90159-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90159-0)
- Giacomelli, L., Nanni, V., Lenzi, L., Zhuang, J., Serra, M. D., Banfield, M. J., ... Moser, C. (2012). Identification and Characterization of the Defensin-Like Gene Family of Grapevine. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(8), 1118-1131. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-11-0323>
- Gonçalves, S., Teixeira, A., Abade, J., de Medeiros, L. N., Kurtenbach, E., & Santos, N. C. (2012). Evaluation of the membrane lipid selectivity of the pea defensin Psd1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(5), 1420-1426. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.02.012>
- Govrin, E. M., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10(13), 751-757. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00560-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00560-1)
- Greenberg, J. T., & Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, 6(3), 201-211. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00361.x>
- Guimarães, L. L., Toledo, M. S., Ferreira, F. A. S., Straus, A. H., & Takahashi, H. K. (2014). Structural diversity and biological significance of glycosphingolipids in pathogenic and opportunistic fungi. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00138>
- Gull, K., & Trinci, A. P. J. (1974). Detection of areas of wall differentiation in fungi using fluorescent staining. *Archives of Microbiology*, 96(1), 53-57. <https://doi.org/10.1007/BF00590162>
- Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology*, 7(4), 133-141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>
- Hammami, R., Ben Hamida, J., Vergoten, G., & Fliss, I. (2009). PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl_1), D963-D968. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn655>
- Haney, E. F., Straus, S. K., & Hancock, R. E. W. (2019). Reassessing the Host Defense Peptide Landscape. *Frontiers in Chemistry*, 7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00043>
- Hanson, B. A., & Lester, R. L. (1980). The extraction of inositol-containing phospholipids and phosphatidylcholine from *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa*. *Journal of Lipid Research*, 21(3), 309-315.
- Hanzawa, H., Shimada, I., Kuzuhara, T., Komano, H., Kohda, D., Inagaki, F., ... Arata, Y. (1990). ¹H nuclear magnetic resonance study of the solution conformation of an antibacterial protein, sapecin. *FEBS Letters*, 269(2), 413-420. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81206-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81206-4)

- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>
- Hayes, B. M. E., Anderson, M. A., Traven, A., van der Weerden, N. L., & Bleackley, M. R. (2014). Activation of stress signalling pathways enhances tolerance of fungi to chemical fungicides and antifungal proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(14), 2651-2666. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1573-8>
- Hayes, B. M. E., Bleackley, M. R., Wiltshire, J. L., Anderson, M. A., Traven, A., & van der Weerden, N. L. (2013). Identification and Mechanism of Action of the Plant Defensin NaD1 as a New Member of the Antifungal Drug Arsenal against *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 3667-3675. <https://doi.org/10.1128/AAC.00365-13>
- Hazlett, L., & Wu, M. (2011). Defensins in innate immunity. *Cell and Tissue Research*, 343(1), 175-188. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1022-4>
- Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015). InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>
- Hegedus, D. D., & Rimmer, S. R. (2005). *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen? *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.040>
- Hegedüs, N., & Marx, F. (2013). Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal Biology Reviews*, 26(4), 132-145. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.002>
- Holz, G., Coertze, S., & Williamson, B. (2007). The Ecology of Botrytis on Plant Surfaces. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (p. 9-27). Consulté à l'adresse https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-2626-3_2
- Hubert, F., Noël, T., & Roch, P. (1996). A Member of the Arthropod Defensin Family from Edible Mediterranean Mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *European Journal of Biochemistry*, 240(1), 302-306. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0302h.x>
- Ifop. (2017, octobre). Les Français, la consommation écoresponsable et la transition écologique. Consulté à l'adresse https://www.wwf.fr/sites/default/files/doc-2017-10/171010_sondage_wwf_ifop_agriculture%202.pdf
- Islam, K. T., Shah, D. M., & El-Mounadi, K. (2017). Live-cell Imaging of Fungal Cells to Investigate Modes of Entry and Subcellular Localization of Antifungal Plant Defensins. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (130), e55995. <https://doi.org/10.3791/55995>
- Isleib, J. (2012, décembre 19). Signs and symptoms of plant disease: Is it fungal, viral or bacterial? Consulté 16 octobre 2018, à l'adresse https://www.canr.msu.edu/news/signs_and_symptoms_of_plant_disease_is_it_fungal_viral_or_bacterial
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W429-W432. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm256>
- Kamthan, A., Chaudhuri, A., Kamthan, M., & Datta, A. (2016). Genetically modified (GM) crops: milestones and new advances in crop improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(9), 1639-1655. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2747-6>
- Kars, I., & van Kan, J. A. L. (2007). Extracellular Enzymes and Metabolites Involved in Pathogenesis of Botrytis. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (p. 99-118). Consulté à l'adresse https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-2626-3_7
- Kersey, P. J., Allen, J. E., Allot, A., Barba, M., Boddie, S., Bolt, B. J., ... Yates, A. (2018). Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D802-D808. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1011>
- King, A. (2017). Technology: The Future of Agriculture. *Nature*, 544, S21-S23. <https://doi.org/10.1038/544S21a>
- Kobayashi, Y., Takashima, H., Tamaoki, H., Kyogoku, Y., Lambert, P., Kuroda, H., ... Moroder, L. (1991). The cystine-stabilized α -helix: A common structural motif of ion-channel blocking neurotoxic peptides. *Biopolymers*, 31(10), 1213-1220. <https://doi.org/10.1002/bip.360311009>

- Koehbach, J. (2017). Structure-Activity Relationships of Insect Defensins. *Frontiers in Chemistry*, 5. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00045>
- Koga, J., Yamauchi, T., Shimura, M., Ogawa, N., Oshima, K., Umemura, K., ... Ogasawara, N. (1998). Cerebrosides A and C, Sphingolipid Elicitors of Hypersensitive Cell Death and Phytoalexin Accumulation in Rice Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 273(48), 31985-31991. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.48.31985>
- Köhler, J. R., Casadevall, A., & Perfect, J. (2015). The Spectrum of Fungi That Infects Humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(1), a019273. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019273>
- Lacerda, A., Vasconcelos, É. A. R., Pelegrini, P. B., & Grossi-de-Sa, M. F. (2014). Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00116>
- Lambert, J., Keppi, E., Dimarcq, J. L., Wicker, C., Reichhart, J. M., Dunbar, B., ... Fothergill, J. (1989). Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranovae* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(1), 262-266. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.1.262>
- Lamberty, M., Ades, S., Uttenweiler-Joseph, S., Brookhart, G., Bushey, D., Hoffmann, J. A., & Bulet, P. (1999). Insect Immunity: Isolation from the Lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity. *Journal of Biological Chemistry*, 274(14), 9320-9326. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9320>
- Lamberty, M., Zachary, D., Lanot, R., Bordereau, C., Robert, A., Hoffmann, J. A., & Bulet, P. (2001a). Insect immunity. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4085-4092. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002998200>
- Lamberty, M., Caille, A., Landon, C., Tassin-Moindrot, S., Hetru, C., Bulet, P., & Vovelle, F. (2001b). Solution structures of the antifungal heliomicin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities. *Biochemistry*, 40(40), 11995-12003. <https://doi.org/10.1021/bi0103563>
- Landon, C., Barbault, F., Legrain, M., Menin, L., Guenneugues, M., Schott, V., ... Dimarcq, J.-L. (2004). Lead optimization of antifungal peptides with 3D NMR structures analysis. *Protein Science*, 13(3), 703-713. <https://doi.org/10.1110/ps.03404404>
- Landon, C., Sodano, P., Hetru, C., Hoffmann, J., & Ptak, M. (1997). Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. *Protein Science*, 6(9), 1878-1884. <https://doi.org/10.1002/pro.5560060908>
- Lay, F. T., Brugliera, F., & Anderson, M. A. (2003a). Isolation and Properties of Floral Defensins from Ornamental Tobacco and Petunia. *Plant Physiology*, 131(3), 1283-1293. <https://doi.org/10.1104/pp.102.016626>
- Lay, F. T., Schirra, H. J., Scanlon, M. J., Anderson, M. A., & Craik, D. J. (2003b). The Three-dimensional Solution Structure of NaD1, a New Floral Defensin from *Nicotiana glauca* and its Application to a Homology Model of the Crop Defense Protein alfAFP. *Journal of Molecular Biology*, 325(1), 175-188. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01103-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01103-8)
- Lee, Y. S., Yun, E. K., Jang, W. S., Kim, I., Lee, J. H., Park, S. Y., ... Lee, I. H. (2004). Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Insect Molecular Biology*, 13(1), 65-72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00462.x>
- Lehrer, R. I. (2004). Primate defensins. *Nature Reviews Microbiology*, 2(9), 727-738. <https://doi.org/10.1038/nrmicro976>
- Lehrer, R. I., & Ganz, T. (2002). Defensins of vertebrate animals. *Current Opinion in Immunology*, 14(1), 96-102. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(01\)00303-X](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00303-X)
- Leipelt, M., Warnecke, D., Zähringer, U., Ott, C., Müller, F., Hube, B., & Heinz, E. (2001). Glucosylceramide Synthases, a Gene Family Responsible for the Biosynthesis of Glucosphingolipids in Animals, Plants, and Fungi. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33621-33629. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104952200>

- Lepage, P., Bitsch, F., Roecklin, D., Keppi, E., Dimarcq, J.-L., Reichhart, J.-M., ... Dorselaer, A. V. (1991). Determination of disulfide bridges in natural and recombinant insect defensin A. *European Journal of Biochemistry*, 196(3), 735-742. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15872.x>
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., ... Chapeland, F. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58(9), 876-888. <https://doi.org/10.1002/ps.566>
- Leroux, P., Lanen, C., & Fritz, R. (1992). Similarities in the antifungal activities of fenpiclonil, iprodione and tolclofos-methyl against *Botrytis cinerea* and *Fusarium nivale*. *Pesticide Science*, 36(3), 255-261. <https://doi.org/10.1002/ps.2780360312>
- Lester, R. L., Smith, S. W., Wells, G. B., Rees, D. C., & Angus, W. W. (1974). The Isolation and Partial Characterization of Two Novel Sphingolipids from *Neurospora crassa*: Di(Inositolphosphoryl)ceramide and [(gal)3glu]ceramide. *Journal of Biological Chemistry*, 249(11), 3388-3394.
- Leverly, S. B., Toledo, M. S., Doong, R. L., Straus, A. H., & Takahashi, H. K. (2000). Comparative analysis of ceramide structural modification found in fungal cerebroside by electrospray tandem mass spectrometry with low energy collision-induced dissociation of Li⁺ adduct ions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14(7), 551-563. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(20000415\)14:7<551::AID-RCM909>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(20000415)14:7<551::AID-RCM909>3.0.CO;2-L)
- Li, H.-X., Hwang, B.-Y., Laxmikanthan, G., Blaber, S. I., Blaber, M., Golubkov, P. A., ... Georgiou, G. (2008). Substrate specificity of human kallikreins 1 and 6 determined by phage display. *Protein Science*, 17(4), 664-672. <https://doi.org/10.1110/ps.073333208>
- Liñeiro, E., Cantoral, J. M., & Fernández-Acero, F. J. (2016). Contribution of Proteomics Research to Understanding *Botrytis* Biology and Pathogenicity. In *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (p. 315-333). Consulté à l'adresse https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-23371-0_16
- Liu, Z.-C., Zhang, R., Zhao, F., Chen, Z.-M., Liu, H.-W., Wang, Y.-J., ... Zhang, Y. (2012). Venomic and Transcriptomic Analysis of Centipede *Scolopendra subspinipes dehaani*. *Journal of Proteome Research*, 11(12), 6197-6212. <https://doi.org/10.1021/pr300881d>
- Lobo, D. S., Pereira, I. B., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L. N., Cabral, L. M., Faria, J., ... Kurtenbach, E. (2007). Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry*, 46(4), 987-996. <https://doi.org/10.1021/bi061441j>
- Lübeck, P. S. (2012). US20120196324A1. United States. Consulté à l'adresse <https://patents.google.com/patent/US20120196324/en>
- Ma, L. J., Van, H. der D., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Di, A. P., ... Rep, M. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464(7287), 367-373. <https://doi.org/10.1038/nature08850>
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
- Mandala, S. M., Thornton, R. A., Frommer, B. R., Curotto, J. E., Rozdilsky, W., Kurtz, M. B., ... Harris, G. H. (1995). The Discovery of Australifungin, a Novel Inhibitor of Sphinganine N-Acyltransferase from *Sporormiella australis*. *The Journal of Antibiotics*, 48(5), 349-356. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.349>
- Masson, V., Arafah, K., Voisin, S., & Bulet, P. (2018). Comparative Proteomics Studies of Insect Cuticle by Tandem Mass Spectrometry: Application of a Novel Proteomics Approach to the Pea Aphid Cuticular Proteins. *PROTEOMICS*, 18(3-4), 1700368. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700368>
- Matsuyama, K., & Natori, S. (1988). Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*. *Journal of Biological Chemistry*, 263(32), 17112-17116.
- McDougall, P. (2017). The Global Agrochemical Market Trends by Crop. Présenté à 11th China International Forum on Development of Pesticide Industry, Shanghai.

- Mendez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G. G., Mendez, R., ... Haro, C. de. (1990). Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, γ -hordothionin, from barley endosperm. *European Journal of Biochemistry*, 194(2), 533-539. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15649.x>
- Merrill, A. H. (2011). Sphingolipid and Glycosphingolipid Metabolic Pathways in the Era of Sphingolipidomics. *Chemical Reviews*, 111(10), 6387-6422. <https://doi.org/10.1021/cr2002917>
- Merrill, A. H., Sullards, M. C., Allegood, J. C., Kelly, S., & Wang, E. (2005). Sphingolipidomics: High-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods*, 36(2), 207-224. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.01.009>
- Michaut, L., Fehlbaum, P., Moniatte, M., Dorsselaer, A. V., Reichhart, J.-M., & Bulet, P. (1996). Determination of the disulfide array of the first inducible antifungal peptide from insects: drosomycin from *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*, 395(1), 6-10. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00992-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00992-1)
- Ministère de l'Agriculture. (2015, octobre 20). PLAN ÉCOPHYTO 2. Consulté à l'adresse http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/151022_ecophyto.pdf
- Morton, V., & Staub, T. (2008). A Short History of Fungicides. *APSnet Feature Articles*. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2008-0308>
- Mosbach, A., Edel, D., Farmer, A. D., Widdison, S., Barchietto, T., Dietrich, R. A., ... Scalliet, G. (2017). Anilinopyrimidine Resistance in *Botrytis cinerea* Is Linked to Mitochondrial Function. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02361>
- Moser, R., Pertot, I., Elad, Y., & Raffaelli, R. (2008). Farmers' attitudes toward the use of biocontrol agents in IPM strawberry production in three countries. *Biological Control*, 47(2), 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.07.012>
- Mouriño-Pérez, R. R. (2013). Septum development in filamentous ascomycetes. *Fungal Biology Reviews*, 27(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.02.002>
- Muñoz, A., Chu, M., Marris, P. I., Sagaram, U. S., Kaur, J., Shah, D. M., & Read, N. D. (2014). Specific domains of plant defensins differentially disrupt colony initiation, cell fusion and calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 92(6), 1357-1374. <https://doi.org/10.1111/mmi.12634>
- Naafs, M. A. B. (2018). The Antimicrobial Peptides: Ready for Clinical Trials? Consulté 29 mars 2019, à l'adresse </paper/The-Antimicrobial-Peptides%3A-Ready-for-Clinical-Naafs/bda03f47afa1dc0c81dbcfb76b3dbbb4340d4e47>
- Nanni, V., Schumacher, J., Giacomelli, L., Brazzale, D., Sbolci, L., Moser, C., ... Baraldi, E. (2014). VvAMP2, a grapevine flower-specific defensin capable of inhibiting *Botrytis cinerea* growth: insights into its mode of action. *Plant Pathology*, 63(4), 899-910. <https://doi.org/10.1111/ppa.12170>
- Nassr, S., & Barakat, R. (2013). Effect of Factors on Conidium Germination of *Botrytis cinerea* in vitro. *International Journal of Plant & Soil Science*, 2(1), 41-54.
- Nimrichter, L., & Rodrigues, M. L. (2011). Fungal Glucosylceramides: From Structural Components to Biologically Active Targets of New Antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00212>
- Osborn, R. W., Samblanx, G. W. D., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Leuven, F. V., ... Broekaert, W. F. (1995). Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Letters*, 368(2), 257-262. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00666-W](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00666-W)
- Otero-González, A. J., Magalhães, B. S., Garcia-Villarino, M., López-Abarrategui, C., Sousa, D. A., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2010). Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *The FASEB Journal*, 24(5), 1320-1334. <https://doi.org/10.1096/fj.09-143388>
- Ou, S. H. (1985). *Rice Diseases* (2nd ed.). Kew, Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute.
- Oura, T., & Kajiwara, S. (2008). Disruption of the sphingolipid $\Delta 8$ -desaturase gene causes a delay in morphological changes in *Candida albicans*. *Microbiology*, 154(12), 3795-3803. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018788-0>

- Panayotatos, N., & Wells, R. D. (1979). Identification, cloning and characterization of three late promoters at 14.6, 14.8 and 15.9% of T7 DNA. *Journal of Molecular Biology*, *135*(1), 91-109. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(79\)90342-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(79)90342-5)
- Park, C., Bennion, B., François, I. E. J. A., Ferket, K. K. A., Cammue, B. P. A., Thevissen, K., & Levery, S. B. (2005). Neutral glycolipids of the filamentous fungus *Neurospora crassa*: altered expression in plant defensin-resistant mutants. *Journal of Lipid Research*, *46*(4), 759-768. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400457-JLR200>
- Parlement Européen. (2009, novembre 24). DIRECTIVE 2009/128/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 21 octobre 2009. Consulté à l'adresse <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:02009L0128-20091125&from=EN>
- Partow, S., Siewers, V., Bjørn, S., Nielsen, J., & Maury, J. (2010). Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *27*(11), 955-964. <https://doi.org/10.1002/yea.1806>
- Patel, R. M., van Kan, J. a. L., Bailey, A. M., & Foster, G. D. (2008). RNA-Mediated Gene Silencing of Superoxide Dismutase (*bcsod1*) in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, *98*(12), 1334-1339. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-12-1334>
- Payne, J. A. E., Bleackley, M. R., Lee, T.-H., Shafee, T. M. A., Poon, I. K. H., Hulett, M. D., ... Anderson, M. A. (2016). The plant defensin NaD1 introduces membrane disorder through a specific interaction with the lipid, phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1858*(6), 1099-1109. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.016>
- Pennisi, E. (2010). Armed and dangerous. *Science*, *327*(5967), 804-805. <https://doi.org/10.1126/science.327.5967.804>
- Perez-Nadales, E., Nogueira, M. F., Baldin, C., Castanheira, S., El, M. G., Grund, E., ... Wendland, J. (2014). Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genetics and Biology : FG & B*, *70*(100), 42-67. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.011>
- Perrone, G. G., Tan, S.-X., & Dawes, I. W. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1783*(7), 1354-1368. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.023>
- Pillonel, C., & Meyer, T. (1997). Effect of Phenylpyrroles on Glycerol Accumulation and Protein Kinase Activity of *Neurospora crassa*. *Pesticide Science*, *49*(3), 229-236. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199703\)49:3<229::AID-PS525>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199703)49:3<229::AID-PS525>3.0.CO;2-T)
- Pinto, M. R., Rodrigues, M. L., Travassos, L. R., Haido, R. M. T., Wait, R., & Barreto-Bergter, E. (2002). Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. *Glycobiology*, *12*(4), 251-260. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.4.251>
- Pisani, C., Voisin, S., Arafah, K., Durand, P., Perrard, M.-H., Guichaoua, M.-R., ... Prat, O. (2016). Ex vivo assessment of testicular toxicity induced by carbendazim and iprodione, alone or in a mixture. *ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation*, *33*(4), 393-413. <https://doi.org/10.14573/altex.1601253>
- Poeta, M. D., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., & Luberto, C. (2014). Synthesis and Biological Properties of Fungal Glucosylceramide. *PLOS Pathogens*, *10*(1), e1003832. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003832>
- Poon, I. K., Baxter, A. A., Lay, F. T., Mills, G. D., Adda, C. G., Payne, J. A., ... Hulett, M. D. (2014). Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis. *eLife*, *3*. <https://doi.org/10.7554/eLife.01808>
- Quidde, T., Osbourn, A. E., & Tudzynski, P. (1998). Detoxification of α -tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *52*(3), 151-165. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1998.0142>
- Ramamoorthy, V., Cahoon, E. B., Li, J., Thokala, M., Minto, R. E., & Shah, D. M. (2007a). Glucosylceramide synthase is essential for alfalfa defensin-mediated growth inhibition but not for pathogenicity of *Fusarium graminearum*. *Molecular Microbiology*, *66*(3), 771-786. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05955.x>

- Ramamoorthy, V., Zhao, X., Snyder, A. K., Xu, J.-R., & Shah, D. M. (2007b). Two mitogen-activated protein kinase signalling cascades mediate basal resistance to antifungal plant defensins in *Fusarium graminearum*. *Cellular Microbiology*, *9*(6), 1491-1506. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00887.x>
- Rautenbach, M., Troskie, A. M., & Vosloo, J. A. (2016). Antifungal peptides: To be or not to be membrane active. *Biochimie*, *130*, 132-145. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.05.013>
- Rella, A., Farnoud, A. M., & Del Poeta, M. (2016). Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence. *Progress in Lipid Research*, *61*, 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.11.003>
- Rezende, L. C. D., & Emery, F. S. (2013). A review of the synthetic strategies for the development of BODIPY dyes for conjugation with proteins. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, *5*(1), 62-83-83. <https://doi.org/10.17807/orbital.v5i1.482>
- Rittershaus, P. C., Kechichian, T. B., Allegood, J. C., Merrill, A. H., Hennig, M., Luberto, C., & Poeta, M. D. (2006). Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*(6), 1651-1659. <https://doi.org/10.1172/JCI27890>
- Rodrigues, M. L., Travassos, L. R., Miranda, K. R., Franzen, A. J., Rozental, S., Souza, W. de, ... Barreto-Bergter, E. (2000). Human Antibodies against a Purified Glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* Inhibit Cell Budding and Fungal Growth. *Infection and Immunity*, *68*(12), 7049-7060. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.7049-7060.2000>
- Roemer, T., Delaney, S., & Bussey, H. (1993). SKN1 and KRE6 define a pair of functional homologs encoding putative membrane proteins involved in beta-glucan synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(7), 4039-4048. <https://doi.org/10.1128/MCB.13.7.4039>
- Rollin-Pinheiro, R., Singh, A., Barreto-Bergter, E., & Del Poeta, M. (2016). Sphingolipids as targets for treatment of fungal infections. *Future Medicinal Chemistry*, *8*(12), 1469-1484. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0053>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rose, M., & Botstein, D. (1983). Structure and function of the yeast URA3 gene differentially regulated expression of hybrid β -galactosidase from overlapping coding sequences in yeast. *Journal of Molecular Biology*, *170*(4), 883-904. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80193-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80193-4)
- Russell, P. E. (2005). A century of fungicide evolution. *The Journal of Agricultural Science*, *143*(1), 11-25. <https://doi.org/10.1017/S0021859605004971>
- Sagaram, U. S., Pandurangi, R., Kaur, J., Smith, T. J., & Shah, D. M. (2011). Structure-Activity Determinants in Antifungal Plant Defensins MsDef1 and MtDef4 with Different Modes of Action against *Fusarium graminearum*. *PLOS ONE*, *6*(4), e18550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018550>
- Sagaram, U. S., El-Mounadi, K., Buchko, G. W., Berg, H. R., Kaur, J., Pandurangi, R. S., ... Shah, D. M. (2013). Structural and Functional Studies of a Phosphatidic Acid-Binding Antifungal Plant Defensin MtDef4: Identification of an RGFRRR Motif Governing Fungal Cell Entry. *PLOS ONE*, *8*(12), e82485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082485>
- Saito, K., Takakuwa, N., Ohnishi, M., & Oda, Y. (2006). Presence of glucosylceramide in yeast and its relation to alkali tolerance of yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *71*(4), 515-521. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0187-3>
- Sakaki, T., Zähringer, U., Warnecke, D. C., Fahl, A., Knogge, W., & Heinz, E. (2001). Sterol glycosides and cerebrosides accumulate in *Pichia pastoris*, *Rhynchosporium secalis* and other fungi under normal conditions or under heat shock and ethanol stress. *Yeast*, *18*(8), 679-695. <https://doi.org/10.1002/yea.720>
- Samblanx, G. W. D., Goderis, I. J., Thevissen, K., Raemaekers, R., Fant, F., Borremans, F., ... Broekaert, W. F. (1997). Mutational Analysis of a Plant Defensin from Radish (*Raphanus sativus* L.) Reveals Two Adjacent Sites Important for Antifungal Activity. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(2), 1171-1179. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.2.1171>

- Scandroglio, F., Loberto, N., Valsecchi, M., Chigorno, V., Prinetti, A., & Sonnino, S. (2008). Thin layer chromatography of gangliosides. *Glycoconjugate Journal*, 26(8), 961. <https://doi.org/10.1007/s10719-008-9145-5>
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368-379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Schuhmann, B., Seitz, V., Vilcinskas, A., & Podsiadlowski, L. (2003). Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 53(3), 125-133. <https://doi.org/10.1002/arch.10091>
- Seebah, S., Suresh, A., Zhuo, S., Choong, Y. H., Chua, H., Chuon, D., ... Verma, C. (2007). Defensins knowledgebase: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_1), D265-D268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl866>
- Selsted, M. E. (2004). θ -Defensins: Cyclic Antimicrobial Peptides Produced by Binary Ligation of Truncated α -Defensins. *Current Protein & Peptide Science*, 5(5), 365-371. <https://doi.org/10.2174/1389203043379459>
- Selsted, M. E., Brown, D. M., DeLange, R. J., & Lehrer, R. I. (1983). Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 258(23), 14485-14489.
- Selsted, M. E., Harwig, S. S., Ganz, T., Schilling, J. W., & Lehrer, R. I. (1985). Primary structures of three human neutrophil defensins. *The Journal of Clinical Investigation*, 76(4), 1436-1439. <https://doi.org/10.1172/JCI112121>
- Selsted, M. E., & Ouellette, A. J. (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature Immunology*, 6(6), 551-557. <https://doi.org/10.1038/ni1206>
- Shafee, T. M. A., Lay, F. T., Hulett, M. D., & Anderson, M. A. (2016). The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies. *Molecular Biology and Evolution*, 33(9), 2345-2356. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw106>
- Shafee, T. M. A., Lay, F. T., Phan, T. K., Anderson, M. A., & Hulett, M. D. (2017). Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(4), 663-682. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2344-5>
- Silva, P. D., Jouvensal, L., Lamberty, M., Bulet, P., Caille, A., & Vovelle, F. (2003). Solution structure of termicin, an antimicrobial peptide from the termite *Pseudacanthotermes spiniger*. *Protein Science*, 12(3), 438-446. <https://doi.org/10.1110/ps.0228303>
- Silva, P. M., Gonçalves, S., & Santos, N. C. (2014). Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00097>
- Singh, A., & Del Poeta, M. (2016). Sphingolipidomics: An Important Mechanistic Tool for Studying Fungal Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00501>
- Singh, P., Paila, Y. D., & Chattopadhyay, A. (2012). Role of glycosphingolipids in the function of human serotonin1A receptors. *Journal of Neurochemistry*, 123(5), 716-724. <https://doi.org/10.1111/jnc.12008>
- Spelbrink, R. G., Dilmac, N., Allen, A., Smith, T. J., Shah, D. M., & Hockerman, G. H. (2004). Differential Antifungal and Calcium Channel-Blocking Activity among Structurally Related Plant Defensins. *Plant Physiology*, 135(4), 2055-2067. <https://doi.org/10.1104/pp.104.040873>
- Spitzer, M., Griffiths, E., Blakely, K. M., Wildenhain, J., Ejim, L., Rossi, L., ... Wright, G. D. (2011). Cross-species discovery of syncretic drug combinations that potentiate the antifungal fluconazole. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 499. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.31>
- Statista. (2018, août 14). Infographie: Les plus gros consommateurs de pesticides en Europe. Consulté 23 octobre 2018, à l'adresse <https://fr.statista.com/infographie/15061/les-plus-gros-consommateurs-de-pesticides-en-europe/>

- Steinberg, G., Peñalva, M. A., Riquelme, M., Wösten, H. A., & Harris, S. D. (2017). Cell Biology of Hyphal Growth. *Microbiology Spectrum*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0034-2016>
- Sullards, M. C., Lynch, D. V., Merrill, A. H., & Adams, J. (2000). Structure determination of soybean and wheat glucosylceramides by tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 35(3), 347-353. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(200003\)35:3<347::AID-JMS941>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(200003)35:3<347::AID-JMS941>3.0.CO;2-3)
- Tanaka, S. (1965). Nutrition of *Piricularia oryzae* in vitro. In *The rice blast disease* (p. 23-34). Baltimore, MD: IRRI-Johns Hopkins Press.
- Tang, Y.-Q., Yuan, J., Ösapay, G., Ösapay, K., Tran, D., Miller, C. J., ... Selsted, M. E. (1999). A Cyclic Antimicrobial Peptide Produced in Primate Leukocytes by the Ligation of Two Truncated α -Defensins. *Science*, 286(5439), 498-502. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.498>
- Tarr, D. E. K. (2016). Establishing a reference array for the CS- α B superfamily of defensive peptides. *BMC Research Notes*, 9(1), 490. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2291-0>
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., & Amparyup, P. (2015). Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. *Developmental & Comparative Immunology*, 48(2), 324-341. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.05.020>
- Tenberge, K. B. (2007). Morphology and Cellular Organisation in Botrytis Interactions with Plants. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (p. 67-84). Consulté à l'adresse https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-2626-3_5
- Ternes, P., Wobbe, T., Schwarz, M., Albrecht, S., Feussner, K., Riezman, I., ... Warnecke, D. (2011). Two Pathways of Sphingolipid Biosynthesis Are Separated in the Yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), 11401-11414. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.193094>
- Terras, F. R., Schoofs, H. M., Bolle, M. F. D., Leuven, F. V., Rees, S. B., Vanderleyden, J., ... Broekaert, W. F. (1992). Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 267(22), 15301-15309.
- Terras, F. R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A., ... Vanderleyden, J. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell*, 7(5), 573-588. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.5.573>
- Thevissen, K., Ghazi, A., Samblanx, G. W. D., Brownlee, C., Osborn, R. W., & Broekaert, W. F. (1996). Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15018-15025. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15018>
- Thevissen, K., Osborn, R. W., Acland, D. P., & Broekaert, W. F. (1997). Specific, High Affinity Binding Sites for an Antifungal Plant Defensin on *Neurospora crassa* Hyphae and Microsomal Membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32176-32181. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32176>
- Thevissen, K., Terras, F. R. G., & Broekaert, W. F. (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5451-5458.
- Thevissen, K., Cammue, B. P. A., Lemaire, K., Winderickx, J., Dickson, R. C., Lester, R. L., ... Broekaert, W. F. (2000a). A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(17), 9531-9536. <https://doi.org/10.1073/pnas.160077797>
- Thevissen, K., Osborn, R. W., Acland, D. P., & Broekaert, W. F. (2000b). Specific Binding Sites for an Antifungal Plant Defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on Fungal Cells Are Required for Antifungal Activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(1), 54-61. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.1.54>
- Thevissen, K., Ferket, K. K. A., François, I. E. J. A., & Cammue, B. P. A. (2003). Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides*, 24(11), 1705-1712. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.09.014>
- Thevissen, K., Warnecke, D. C., François, I. E. J. A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., ... Cammue, B. P. A. (2004). Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 3900-3905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311165200>

- Thevissen, K., Idkowiak-Baldys, J., Im, Y.-J., Takemoto, J., François, I. E. J. A., Ferket, K. K. A., ... Cammue, B. P. A. (2005). SKN1, a novel plant defensin-sensitivity gene in *Saccharomyces cerevisiae*, is implicated in sphingolipid biosynthesis. *FEBS Letters*, *579*(9), 1973-1977. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.043>
- Thevissen, K., Tavares, P. de M., Xu, D., Blankenship, J., Vandenbosch, D., Idkowiak-Baldys, J., ... Cammue, B. P. A. (2012). The plant defensin RsAFP2 induces cell wall stress, septin mislocalization and accumulation of ceramides in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, *84*(1), 166-180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08017.x>
- Thomma, B. P. H. J., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta*, *216*(2), 193-202. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0902-6>
- Tincu, J. A., & Taylor, S. W. (2004). Antimicrobial Peptides from Marine Invertebrates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(10), 3645-3654. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3645-3654.2004>
- Toledo, M. S., Levery, S. B., Straus, A. H., Suzuki, E., Momany, M., Glushka, J., ... Takahashi, H. K. (1999). Characterization of Sphingolipids from Mycopathogens: Factors Correlating with Expression of 2-Hydroxy Fatty Acyl (E)- Δ 3-Unsaturation in Cerebrosides of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Aspergillus fumigatus*. *Biochemistry*, *38*(22), 7294-7306. <https://doi.org/10.1021/bi982898z>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(9), 4350-4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- United Nations. (2017). World Population Prospects. Consulté à l'adresse https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2017_DataBooklet.pdf
- USDA. (2018). *World Agricultural Production* (World Production, Markets, and Trade Reports No. WAP 10-18) (p. 1-31). Foreign Agricultural Service: U.S. Department of Agriculture. Consulté à l'adresse <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>
- van Baarlen, P., Woltering, E. J., Staats, M., & Kan, J. a. L. V. (2007). Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. *Molecular Plant Pathology*, *8*(1), 41-54. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00367.x>
- van den Bosch, F., Oliver, R., Berg, F. van den, & Paveley, N. (2014). Governing Principles Can Guide Fungicide-Resistance Management Tactics. *Annual Review of Phytopathology*, *52*(1), 175-195. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-050158>
- van der Weerden, N. L., Lay, F. T., & Anderson, M. A. (2008). The Plant Defensin, NaD1, Enters the Cytoplasm of *Fusarium Oxysporum* Hyphae. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(21), 14445-14452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709867200>
- van der Weerden, N. L., Hancock, R. E. W., & Anderson, M. A. (2010). Permeabilization of Fungal Hyphae by the Plant Defensin NaD1 Occurs through a Cell Wall-dependent Process. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(48), 37513-37520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.134882>
- van der Weerden, N. L., & Anderson, M. A. (2013). Plant defensins: Common fold, multiple functions. *Fungal Biology Reviews*, *26*(4), 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.08.004>
- van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. A. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*(19), 3545-3570. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1260-1>
- van Echten-Deckert, G. (2000). [7] - Sphingolipid Extraction and Analysis by Thin-Layer Chromatography. In A. H. Merrill & Y. A. Hannun (Éd.), *Methods in Enzymology* (Vol. 312, p. 64-79). Academic Press. Consulté à l'adresse <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687900129003>
- van Kan, J. A. L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, *11*(5), 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.03.005>
- van Kan, J. A. L., Stassen, J. H. M., Mosbach, A., Lee, T. A. J. V. D., Faino, L., Farmer, A. D., ... Scalliet, G. (2017). A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, *18*(1), 75-89. <https://doi.org/10.1111/mpp.12384>

- Villas Boas, M. H. S., Egge, H., Pohlentz, G., Hartmann, R., & Barreto Bergter, E. (1994). Structural determination of N-2'-hydroxyoctadecenoyl-1-O- β -D-glucopyranosyl-9-methyl-4, 8-sphingadienine from species of *Aspergillus*. *Chemistry and Physics of Lipids*, *70*(1), 11-19. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(94\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0009-3084(94)90043-4)
- Vriens, K., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2014). Antifungal Plant Defensins: Mechanisms of Action and Production. *Molecules*, *19*(8), 12280-12303. <https://doi.org/10.3390/molecules190812280>
- Vriens, K., Cools, T. L., Harvey, P. J., Craik, D. J., Spincemaille, P., Cassiman, D., ... Thevissen, K. (2015). Synergistic Activity of the Plant Defensin HsAFP1 and Caspofungin against *Candida albicans* Biofilms and Planktonic Cultures. *PLOS ONE*, *10*(8), e0132701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132701>
- Vriens, K., Cools, T. L., Harvey, P. J., Craik, D. J., Braem, A., Vleugels, J., ... Thevissen, K. (2016). The radish defensins RsAFP1 and RsAFP2 act synergistically with caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Peptides*, *75*, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.11.001>
- Wang, G. (2014). Human Antimicrobial Peptides and Proteins. *Pharmaceuticals*, *7*(5), 545-594. <https://doi.org/10.3390/ph7050545>
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D1087-D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>
- Warnecke, D., & Heinz, E. (2003). Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *60*(5), 919-941. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2243-4>
- Wilkins, M. R., Appel, R. D., Williams, K. L., & Hochstrasser, D. F. (Éd.). (2007). *Proteome Research: Concepts, Technology and Application* (2^e éd.). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. Consulté à l'adresse <https://www.springer.com/la/book/9783540712404>
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, *8*(5), 561-580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Wommack, A. J., Robson, S. A., Wanniarachchi, Y. A., Wan, A., Turner, C. J., Wagner, G., & Nolan, E. M. (2012). NMR Solution Structure and Condition-Dependent Oligomerization of the Antimicrobial Peptide Human Defensin 5. *Biochemistry*, *51*(48), 9624-9637. <https://doi.org/10.1021/bi301255u>
- Wu, J., Gao, B., Zhu, S., Wu, J., Gao, B., & Zhu, S. (2014). The Fungal Defensin Family Enlarged. *Pharmaceuticals*, *7*(8), 866-880. <https://doi.org/10.3390/ph7080866>
- Xiao, Y., Hughes, A. L., Ando, J., Matsuda, Y., Cheng, J.-F., Skinner-Noble, D., & Zhang, G. (2004). A genome-wide screen identifies a single β -defensin gene cluster in the chicken: implications for the origin and evolution of mammalian defensins. *BMC Genomics*, *5*(1), 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-5-56>
- Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L. W., & Oppenheim, J. J. (2002). Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends in Immunology*, *23*(6), 291-296. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02246-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02246-9)
- Yang, Y.-S., Mitta, G., Chavanieu, A., Calas, B., Sanchez, J. F., Roch, P., & Aumelas, A. (2000). Solution Structure and Activity of the Synthetic Four-Disulfide Bond Mediterranean Mussel Defensin (MGD-1). *Biochemistry*, *39*(47), 14436-14447. <https://doi.org/10.1021/bi0011835>
- Yi, H.-Y., Chowdhury, M., Huang, Y.-D., & Yu, X.-Q. (2014). Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(13), 5807-5822. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6>
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E. S., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., ... Nayak S, C. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, *40*(2), 182-207. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv045>
- Zhang, Y., Lamm, R., Pillonel, C., Lam, S., & Xu, J.-R. (2002). Osmoregulation and Fungicide Resistance: the *Neurospora crassa* os-2 Gene Encodes a HOG1 Mitogen-Activated Protein Kinase Homologue. *Appl. Environ. Microbiol.*, *68*(2), 532-538. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.532-538.2002>
- Zhang, Z.-T., & Zhu, S.-Y. (2009). Drosomycin, an essential component of antifungal defence in *Drosophila*. *Insect Molecular Biology*, *18*(5), 549-556. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00907.x>

- Zhao, C., Fernandez, A., Avlonitis, N., Vande Velde, G., Bradley, M., Read, N. D., & Vendrell, M. (2016). Searching for the Optimal Fluorophore to Label Antimicrobial Peptides. *ACS Combinatorial Science*, *18*(11), 689-696. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.6b00081>
- Zhu, S. (2008). Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CS α β defensins. *Molecular Immunology*, *45*(3), 828-838. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.06.354>
- Zhu, S., & Gao, B. (2013). Evolutionary origin of β -defensins. *Developmental & Comparative Immunology*, *39*(1), 79-84. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.02.011>
- Zhu, S., Gao, B., & Tytgat, J. (2005). Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CS α β superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *62*(19-20), 2257-2269. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5200-6>
- Zhu, W., Ronen, M., Gur, Y., Minz-Dub, A., Masrati, G., Ben-Tal, N., ... Sharon, A. (2017). BcXYG1, a Secreted Xyloglucanase from *Botrytis cinerea*, Triggers Both Cell Death and Plant Immune Responses. *Plant Physiology*, *175*(1), 438-456. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00375>

ANNEXES

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1. Classification des modes d'action antifongiques selon le FRAC	219
Annexe 2. Composition des milieux de culture.....	221
Annexe 3. Carte génétique du plasmide pDEF151.....	225
Annexe 4. Analyse séquentielle de la protéine recombinante ETD151r	227
Annexe 5. Spectre MALDI-MS du peptide ¹⁵ N-ETD151r	229

Annexe 2. Composition des milieux de culture

Milieu « Potato Dextrose Agar » (PDA)

Potato Dextrose Agar	39 g
Eau Milli-Q	1 L

Autoclave 20 min à 121 °C.

Milieu minimum (Milieu Tanaka sans extrait de levure)

Glucose	10 g
NaNO ₃	2,0 g
Phosphate de monopotassium (KH ₂ PO ₄)	2,0 g
Sulfate de magnésium heptahydrate (MgSO ₄ , 7 H ₂ O)	0,5 g
Chlorure de calcium dihydrate (CaCl ₂ , 2 H ₂ O)	0,1 g
Eau Milli-Q (QSP)	1 L

Autoclave 20 min à 121 °C.

Stock oligo-éléments (1000X) 1 mL

Sulfate de zinc heptahydrate (ZnSO ₄ , 7 H ₂ O)	7,90 g	-
Sulfate de cuivre pentahydrate (CuSO ₄ , 5 H ₂ O)	0,60 g	-
Acide borique (H ₃ BO ₃)	0,10 g	-
Sulfate de manganèse hydrate (MnSO ₄ , H ₂ O)	0,20 g	-
Molybdate de sodium dihydrate (Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O)	0,14 g	-
Eau Milli-Q	1 000 mL	-

Solution filtrée sur membrane de 0,2 µm.

Stock vitamines (100X) 1 mL

Thiamine (B ₁)	100 mg	-
Biotine (B ₈)	0,5 mg	-
Eau Milli-Q	100 mL	-

Solution filtrée sur membrane de 0,2 µm. Aliquots conservés à -20 °C.

Stock fer (100X) 1 mL

Sulfate de fer heptahydrate (FeSO ₄ , 7 H ₂ O)	0,4 g	-
Eau Milli-Q	100 mL	-

Solution filtrée sur membrane de 0,2 µm. Aliquots conservés à -20 °C.

Ajustement du pH entre 5,5 et 5,8.

Milieu « Potato Dextrose Broth » dilué au quart (PDB ¼)

Potato Dextrose Broth	6,0 g
Eau Milli-Q	1 L

Autoclave 20 min à 121 °C.

Milieu « Glucose Yeast mycological Peptone » (GYPm)

Glucose	14,6 g
Yeast extract	1,4 g
Peptone mycologique	7,1 g
Eau Milli-Q	1 L

Autoclave 20 min à 121 °C.

Milieu « Yeast Nitrogen Base » (YNB)

Yeast Nitrogen Base without amino acid	6,7 g
Glucose ou Galactose	20 g
Acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique (MES) monohydrate	10,66 g
Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique (MOPS)	10,46 g
<i>Agar (pour milieu solide)</i>	15 g
Eau Milli-Q	1 L

Ajustement du pH à 6,5 avec NaOH 1M. Autoclave 20 min à 121 °C.

Ajout des acides aminés ou nucléotides nécessaires à la souche : 1 mL pour 100 mL de milieu

Milieu « Yeast extract Peptone Dextrose » (YPD)

Yeast extract	10 g
Peptone	20 g
Glucose	20 g
<i>Agar (pour milieu solide)</i>	15 g
Eau Milli-Q	1 L

Autoclave 20 min à 121 °C.

Ajout des acides aminés ou nucléotides nécessaires à la souche : 1 mL pour 100 mL de milieu

Stock acides aminés et nucléotides (100X)

L-leucine (Leu)	0,8 g	L-tryptophane (Trp)	0,5 g
L-histidine (His)	0,2 g	L-adénine hydrochloride (Ade)	0,5 g
L-uracile	0,5 g	Eau Milli-Q	100 mL

Solutions préparées individuellement, filtrées sur membrane de 0,2 µm et conservées à 4 °C.

Milieu synthétique (SYNT)

Glucose ou Galactose	26,3 g
Sulfate d'ammonium ((NH ₄) ₂ SO ₄)	15 g
Phosphate de monopotassium (KH ₂ PO ₄)	8,0 g
Sulfate de magnésium heptahydrate (MgSO ₄ , 7 H ₂ O)	3,0 g
Eau Milli-Q (QSP)	1 L

Milieu filtré sur membrane de 0,2 µm.

Mélange vitamines 12 mL

Thiamine hydrochloride (B ₁)	1,0 g	-
Myo-inositol	25 g	-
Pyridoxine hydrochloride (B ₆)	1,0 g	-
D-pantothénate de calcium (B ₅)	1,0 g	-
Biotine (B ₈)	0,05 g	-
Acide 4-aminobenzoïque (H ₁)	0,2 g	-
Acide nicotinique (B ₃)	1,0 g	-
Eau Milli-Q	1 L	-

Solution filtrée sur membrane de 0,2 µm. Aliquots conservés à -20 °C.

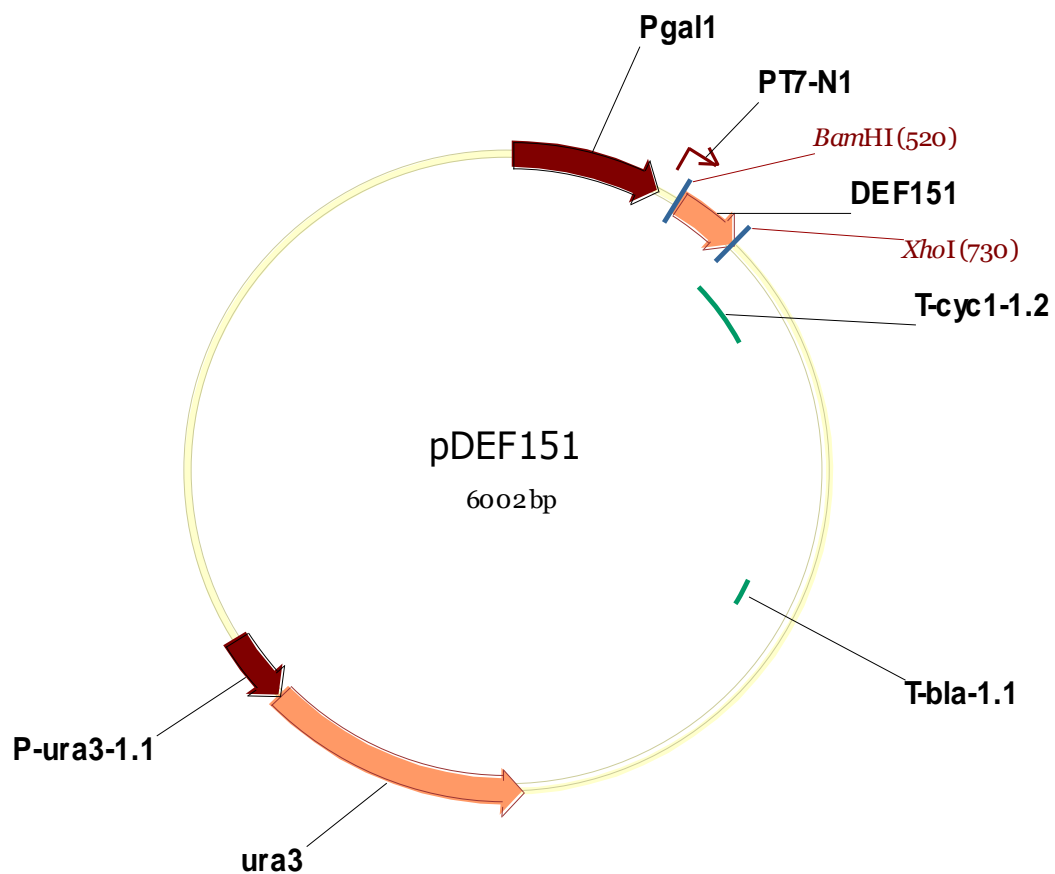
Mélange trace métaux 10 mL

Sel disodique de l'EDTA dihydrate (Na ₂ EDTA, 2 H ₂ O)	15 g	-
Sulfate de fer heptahydrate (FeSO ₄ , 7 H ₂ O)	2,78 g	-
Chlorure de manganèse tetrahydrate (MnCl ₂ , 4 H ₂ O)	0,30 g	-
Sulfate de zinc heptahydrate (ZnSO ₄ , 7 H ₂ O)	5,75 g	-
Sulfate de cuivre pentahydrate (CuSO ₄ , 5 H ₂ O)	0,50 g	-
Chlorure de cobalt hexahydrate (CoCl ₂ , 6 H ₂ O)	0,476 g	-
Molybdate de sodium dihydrate (Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O)	0,484 g	-
Chlorure de calcium dihydrate (CaCl ₂ , 2 H ₂ O)	2,94 g	-
Eau Milli-Q	1 L	-

Solution filtrée sur membrane de 0,2 µm. Aliquots conservés à -20 °C.

N.B. Après autoclave, les milieux solides sont coulés à une température de 50 à 60 °C en boîtes de Petri (15 mL) ensuite stockées à 4 °C. Les milieux liquides sont conservés à température ambiante, à l'exception du milieu minimum (obscurité, 4 °C).

Annexe 3. Carte génétique du plasmide pDEF151



Pgal1	Promoteur d'expression recombinante
PT7-N1	Séquence promotrice minimale (Panayotatos & Wells, 1979)
BamHI - XhoI	Enzymes de restriction
DEF151	Séquence codante intégrant preBGL2 et ETD151
T-cyc1-1.2	Termineur de transcription
T-bla-1.1	Région 3'-UTR (Bolivar <i>et al.</i> , 1977)
ura3	Gène pour la sélection des transformants prototrophe en uracile

Annexe 4. Analyse séquentielle de la protéine recombinante ETD151r

Séquence du gène synthétique DEF151 construit pour l'expression recombinante

NNNNNNNNN...GGATCCATGCGTTTCTCTACTACACTCGCTACTGCAGCTACTGCGCTATTTTTTACACA
GCCTCCCAAGTTTCAGCTGATAAATTGATTGGTCTTGTGTTTGGGGTGCTGTTAATTATACTTCTAAT
TGTAGAGCTGAATGTAAAAGAAGAGGTTATAAAGGTGGTCATTGTGGTCTTTTGCTAATGTTAATT
GTTGGTGTGAACTTAACTCGAG...NNNNNNNNN

Code couleur : BamHI, XhoI, preBGL2, ETD151

Séquence de la protéine recombinante ETD151r non clivée

RFSTTLATAATALFFTASQVSA DKLIGSCVWGAVNYTSNCRAECKRRGYKGGHCGSFANVNCWCET

Décomposition de la séquence en acides aminés

	Acides aminés	Masse (Da)	Masse totale (Da)
DKLIGSCVWGAVNYTSNCRAECKRRGYKGGHCGSFANVNCWCET	44	4 839	ETD151r
RFSTTLATAATALFFTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	22	2 262	7 101
FSTTLATAATALFFTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	21	2 106	6 945
STTLATAATALFFTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	20	1 959	6 798
TTLATAATALFFTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	19	1 872	6 711
TLATAATALFFTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	18	1 771	6 610
LATAATALFFTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	17	1 669	6 508
ATAATALFFTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	16	1 556	6 395
TAATALFFTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	15	1 485	6 324
AATALFFTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	14	1 384	6 223
ATALFFTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	13	1 313	6 152
TALFFTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	12	1 242	6 081
ALFFTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	11	1 141	5 980
LFFTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	10	1 070	5 909
FFTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	9	957	5 796
FTASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	8	809	5 648
TASQVSA DKLIGSCVWG[....]FANVNCWCET	7	662	5 501

Annexe 5. Spectre MALDI-MS du peptide ^{15}N -ETD151r

ABSTRACT

Phytopathogenic fungi are the main cause of crop diseases. *Botrytis cinerea* is a necrotrophic fungus, responsible for the gray mold, targeting many plants of agronomic interest (tomato, grapevine, strawberry). The extensive control of this disease integrates research for new antifungal solutions derived from natural molecules such as antimicrobial peptides (AMPs). The peptide ETD151 is an exclusively antifungal AMP optimized from heliomicin, an insect defensin from the butterfly *Heliothis virescens*. This small cationic, cysteine-rich and non-cytotoxic peptide demonstrates a promising *in vitro* activity on phytopathogenic fungi including *B. cinerea*. Using multidisciplinary approaches (proteomics, sphingolipidomics, confocal microscopy), this thesis focused on a better understanding of the mechanism of action of ETD151, with the eventual goal of developing a new crop protection strategy. As a first step, bottom-up proteomic studies were conducted on *B. cinerea* mycelium in the presence or absence of the peptide. Differential analysis of the results allowed us to identify proteins and metabolic pathways, such as the respiratory chain, impacted by ETD151. Thereafter and based on its strong homology with heliomicin, we have demonstrated the prominent role of membrane lipids called glucosylceramides in the activity of ETD151. Two forms *Bc-GlcCer-2* and *Bc-GlcCer-3* have been characterized by mass spectrometry in *B. cinerea* and explain the sensitivity of the fungus to the antifungal peptide. These results contributed to the current protein-lipid interaction studies in NMR. Finally, we have been able to define ETD151 as a morphogenic defensin in *B. cinerea*, as a few insects and plants antifungal defensins. Indeed, the peptide inhibits spore germination and hyphal elongation while at the same time altering the morphology of the fungus. It also disrupts the membrane integrity and leads to the release of intracellular content, non-mechanically and without acting directly on the high-osmolarity glycerol pathway. By combination with BODIPY fluorophore, we have revealed a particular affinity of ETD151 for the cell envelope and its internalization.

Keywords: Insect defensin, Antifungal defensin, *Botrytis cinerea*, Proteomics, Glucosylceramides

RESUME

Les champignons phytopathogènes sont la principale cause de maladies chez les plantes cultivées. *Botrytis cinerea* est un champignon nécrotrophe, responsable de la pourriture grise, ciblant de nombreuses cultures d'intérêt agronomique (tomate, vigne, fraise). La lutte contre ce pathogène intègre la recherche de nouvelles solutions antifongiques dérivées de molécules naturelles telles que les peptides antimicrobiens (PAMs). Le peptide ETD151 est un PAM exclusivement antifongique optimisé à partir de l'héliomicine, une défensine d'insecte isolée chez le papillon *Heliothis virescens*. Ce petit peptide cationique, riche en cystéine et non-cytotoxique démontre une activité *in vitro* prometteuse sur les champignons phytopathogènes dont *B. cinerea*. Ces travaux de thèse ont visé par des approches pluridisciplinaires (protéomique, sphingolipidomique, microscopie confocale) à une meilleure compréhension du mécanisme d'action du peptide ETD151, dans le but éventuel de développer une nouvelle stratégie de protection des cultures. Dans un premier temps, des études protéomiques de type « bottom-up » ont été conduites sur du mycélium de *B. cinerea* en présence ou absence du peptide. L'analyse différentielle des résultats a permis d'identifier des protéines et des voies métaboliques, telle que la chaîne respiratoire, impactées par le peptide ETD151. Dans un second temps et en s'appuyant sur sa forte homologie avec l'héliomicine, nous avons démontré le rôle prépondérant de certains lipides membranaires appelés glucosylcéramides dans l'activité du peptide ETD151. Deux formes de ces lipides, *Bc-GlcCer-2* et *Bc-GlcCer-3*, ont été caractérisées par spectrométrie de masse chez *B. cinerea* et permettent d'expliquer la sensibilité du champignon au peptide antifongique. Ces résultats ont guidé les études d'interaction protéine-lipide par RMN actuellement en cours. Enfin, nous avons pu définir le peptide ETD151 comme une défensine morphogénique chez *B. cinerea*, à l'instar de certaines défensines antifongiques d'insectes et de plantes. En effet, le peptide inhibe la germination des spores et l'élongation des hyphes tout en modifiant la morphologie du champignon. Il perturbe également l'intégrité membranaire et aboutit à la libération du contenu intracellulaire, de façon non mécanique et sans agir directement sur la voie contrôlant l'osmorégulation. Par conjugaison avec le fluorophore BODIPY, nous avons révélé une affinité particulière du peptide ETD151 pour l'enveloppe cellulaire et son internalisation.

Mots clés : Défensine d'insecte, Défensine antifongique, *Botrytis cinerea*, Protéomique, Glucosylcéramides