HAL
open science

Implication de la voie de N-acétylation dans la détoxication des amines aromatiques par Trichoderma reesei et Chaetomium globosum

Angélique Cocaign, Philippe Silar, Florent Busi, Christian Mougin, Fernando Rodrigues-Lima, Jean-Marie Dupret, Julien Dairou

To cite this version:

Angélique Cocaign, Philippe Silar, Florent Busi, Christian Mougin, Fernando Rodrigues-Lima, et al.. Implication de la voie de N-acétylation dans la détoxication des amines aromatiques par Trichoderma reesei et Chaetomium globosum. Colloque ARET, Jun 2013, Paris, France. 2013. hal-02746861

HAL Id: hal-02746861

https://hal.inrae.fr/hal-02746861

Submitted on 25 Mar 2023

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.

Implication de la voie de *N*-acétylation dans la détoxication des amines aromatiques chez deux champignons filamenteux.

Angélique Cocaign, Linh-Chi Bui, Philippe Silar, Laetitia Chan Ho Tong, Florent Busi, Christian Mougin, Fernando Rodrigues-Lima, Jean-Marie Dupret et Julien Dairou

Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative (BFA), Equipe des Réponses moléculaires et cellulaires aux xénobiotiques (RMCX).
Université Paris Diderot - EAC 4413, 4 rue Marie-Andrée Lagroua Weill-Hallé 75205 Paris Cedex 13

angelique.cocaign@gmail.com

Introduction

L'accumulation de xénobiotiques anthropiques dans les milieux naturels est un problème récurrent. Pour se défendre contre les effets toxiques de ces polluants les êtres vivants utilisent plusieurs voies métaboliques dont la voie de *N*-acétylation catalysée par les arylamine *N*-acétyltransférases (NAT). Les NATs, membres de la famille des enzymes du métabolisme des xénobiotiques, catalysent le transfert d'un groupement acétyl de l'acétyl-coenzyme A sur les amines aromatiques (AA), contribuant ainsi à leur détoxication. De précédents travaux ont montré que l'ascomycète *Podospora anserina* pourrait détoxiquer efficacement des composés de type AA grâce à son activité NAT. Un premier criblage effectué sur sept champignons possédant des gènes *NAT*, a permis de sélectionné deux champignons communément retrouvés dans les sols : *T. reesei* [(HYPJE)NAT1] et le champignon X [(X)NAT1/2]. Le travail présenté ici a permis de caractériser biochimiquement ces enzymes et d'étudier leur implication dans la détoxication des AA.

Tolérance aux amines aromatiques

- ***T. reesei* est plus tolérant que le *champignon X* à de fortes concentrations de 3,4-DCA (dérivé de pesticide). L'acétylation de l'AA augmente la tolérance des deux champignons à cette molécule.**
- **Hypothèse : la voie de *N*-acétylation pourrait être l'un des mécanismes de défense employé par ces deux champignons pour résister aux AA.**

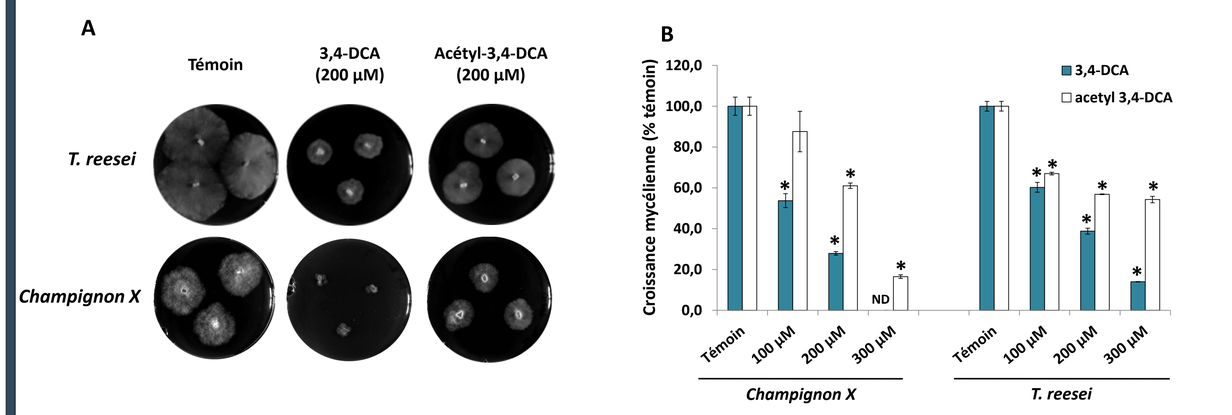


Figure 1 : Tolérance de *T. reesei* et du champignon X à la 3,4-DCA, une amine aromatique toxique. A) Les souches ont été cultivées sur le milieu M2 agar complémenté par de la 3,4-DCA ou de l'acétyl-3,4-DCA à la concentration indiquée. Les photographies ont été prises après 3 jours de culture à 27°C. **B)** Taux de croissance de *T. reesei* et du champignon X en présence de concentrations croissantes de 3,4-DCA ou d'acétyl-3,4-DCA. Les valeurs présentées sont la moyenne d'un triplicat d'expériences indépendantes ± ET. *p < 0.05 *versus* témoin. ND: non détecté.

Caractérisation fonctionnelle des enzymes recombinantes (HYPJE)NAT1 et (X)NAT1

- **Les deux NAT présentent la même spécificité de substrat.**
- **L'efficacité catalytique de (X)NAT1 est nettement supérieure à celle de (HYPJE)NAT1 pour les 8 substrats testés.**
- **(X)NAT2 ne présente pas d'activité NAT AcCoA-dépendante.**

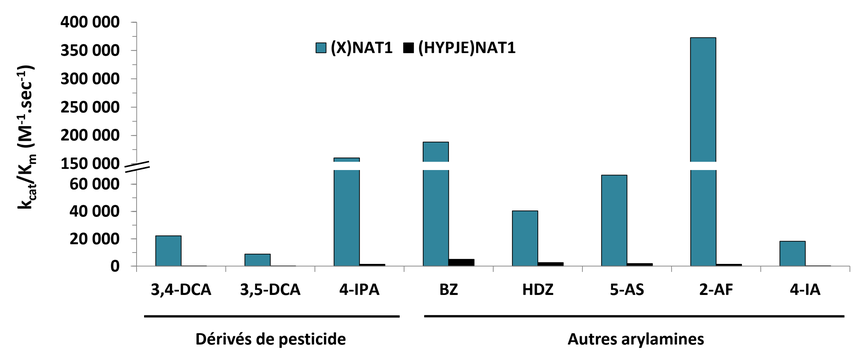


Figure 2 : Efficacité catalytique de (X)NAT1 et (HYPJE)NAT1 envers divers substrats typiques des NATs. Les activités ont été mesurées avec le test au DTNB. Ce test permet de quantifier le taux d'hydrolyse de l'AcCoA (400 µM) en présence de l'AA. Les V_{max} et K_m apparents ont été déterminés à partir de l'équation de Michaelis-Menten. Trois expériences indépendantes ont été réalisées, les erreurs des valeurs obtenues ne dépassent pas ± 5 %. 3,5-DCA : 3,5-(dichloroaniline); 4-IPA : 4-isopropylaniline; BZ : benzidine; HDZ : hydralazine; 5-AS : 5-aminosalicylate; 2-AF : 2-aminofluorene; 4-IA : 4-iodoaniline.

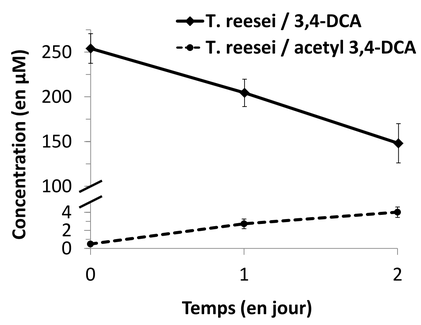
Biotransformation *in vivo*

- **Activité NAT AcCoA-dépendante détectée dans les lysats fongiques : NAT exprimées et fonctionnelles chez les deux espèces** (Fig. 3A)
- **Le *champignon X*, contrairement à *T. reesei*, privilégie l'utilisation de la voie de *N*-acétylation pour le métabolisme des AA.** (Fig. 3 B et C)

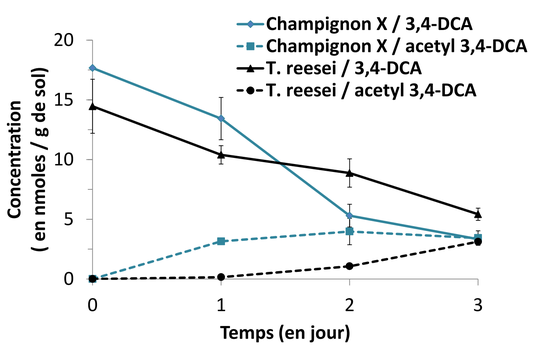
A. N-*acétylation dans les lysats fongiques*

Souche	Activité NAT (pmol.min^{-1}.mg^{-1})
T. reesei	61.8 ± 2.5
Champignon X	374.6 ± 35.8

B. *Biotransformation de la 3,4-DCA en milieu de culture*



C. *Biotransformation dans un sol contaminé*



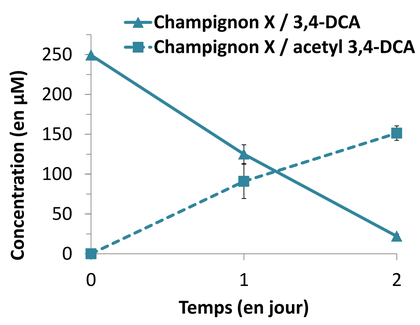
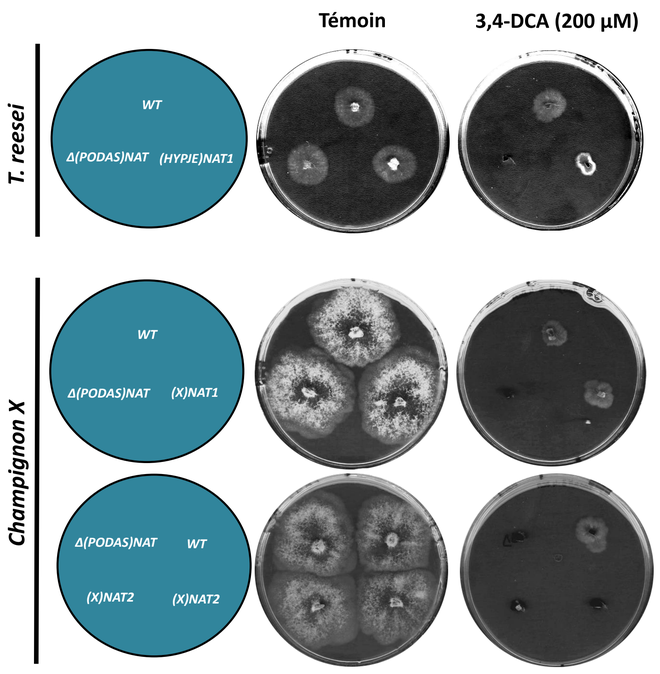


Figure 3 *:* Acétylation *in vivo* d'AA par *T. reesei* et le *champignon X*. A) *N*-acétylation du 2-AF dans les lysats fongiques. Les activités ont été mesurées par HPLC après lyse du mycélium, avec 1 mM de 2-AF et 1 mM d'AcCoA. Les données présentées correspondent à la moyenne ± ET de trois expériences indépendantes. **B)** *T. reesei* et le champignon X ont été cultivés dans du milieu liquide complémenté par 250 µM de 3,4-DCA. A différents temps, la 3,4-DCA et l'acétyl-3,4-DCA ont été détectés dans le milieu de culture et quantifiés par HPLC. Les données tiennent compte de la dégradation abiotique des composés et correspondent à la moyenne ± ET de trois expériences indépendantes. **C)** *T. reesei* et le champignon X ont été inoculés dans un sol stérile contaminé par de la 3,4-DCA (20 mg.kg^{-1}). A différents temps, la 3,4-DCA et l'acétyl-3,4-DCA ont été extraits d'aliquotes de sol et analysés par HPLC. Les données présentées correspondent à la moyenne ± ET de trois expériences indépendantes.

Complémentation de *P. anserina ΔNAT1/2* par (HYPJE)NAT1 et (X)NAT1

- **L'expression de l'isoforme NAT1 du *champignon X* ou de *T. reesei* chez *P. anserina Δ(PODAS)NAT1/2* a permis de rétablir la résistance vis-à-vis du 3,4-DCA ainsi qu'une activité NAT endogène similaire à celle obtenue avec *P. anserina* WT** (Fig. 4 A et B).
- **(HYPJE)NAT1 et (X)NAT1 ont donc clairement un rôle dans la tolérance aux AA chez *T. reesei* et le champignon X.**

A. *Tolérance à la 3,4-DCA*



B. N-*acétylation dans les lysats fongiques*

Souche	Activité NAT (pmol.min^{-1}.mg^{-1})
WT	808 ± 151
Δ(PODAS)NAT1/2	37 ± 0,5
(HYPJE)NAT1	512 ± 19

Souche	Activité NAT (pmol.min^{-1}.mg^{-1})
WT	312,5 ± 24,9
Δ(PODAS)NAT1/2	12,7 ± 0,3
(X)NAT1	203,5 ± 11,1
(X)NAT2	4,4 ± 1,5

Figure 4 *:* Contribution des enzymes (HYPJE)NAT1 et (X)NAT1 dans la tolérance au 3,4-DCA. A) Tolérance de *P. anserina WT*, *P. anserina Δ(PODAS)NAT1/2* et *P. anserina Δ(PODAS)NAT1/2–(HYPJE)NAT1 ou –(X)NAT1/2 à la* 3,4-DCA. Les souches ont été cultivées sur du milieu M2 agar complémenté par de la 3,4-DCA (0 or 200 µM). B) *N*-acétylation du 2-AF dans les lysats fongiques. Les activités ont été mesurées par HPLC après lyse du mycélium avec 1 mM de 2-AF et 1 mM d'AcCoA. Les données présentées correspondent à la moyenne ± ET de trois expériences indépendantes.

Conclusion

Les NATs sont des enzymes du métabolisme des xénobiotiques qui jouent un rôle important dans la détoxication de nombreux polluants tels que les produits chimiques, les colorants, les médicaments et les dérivés de pesticides. Nous avons démontré ici que *T. reesei* et le *champignon X* possèdent des enzymes NAT fonctionnelles actives contre divers substrats anthropiques. Bien que *T. reesei* soit plus tolérant aux AA que le champignon X, la caractérisation enzymatique in vitro de leur NAT a montré que (X)NAT1 a une efficacité catalytique supérieure à celle de (HYPJE)NAT1. Ces résultats ont été confirmés par des études *in vivo* : les deux espèces métabolisent efficacement la 3,4-DCA mais seul le *champignon X* utilise la voie de *N*-acétylation comme mécanisme majeur de détoxication. La complémentation de la souche *P. anserina Δ(PODAS)NAT1/2* par (HYPJE)NAT1 ou (X)NAT1 démontre néanmoins l'importance des NATs dans la détoxication des AA chez ces deux champignons.