

PATRICK ST-PIERRE

**OXYGÉNATION DU TRICHODIÈNE
PAR UN SYSTÈME ACELLULAIRE DE *FUSARIUM CULMORUM***

Mémoire
Présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation :

Rolf Morosoli, Ph.D.
Joanne Paquin, Ph.D.
Lolita Zamir, Ph.D.

HIVER 1999
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
Université du Québec

*À mes parents,
Micheline et Alain*

«Le chercheur qui manque de culture fait souvent preuve de naïveté lorsque, conduit à faire des incursions dans d'autres spécialités aux franges de sa propre compétence, il essaye de se forger une doctrine personnelle.»

Gérard Vergnaud,
Les sciences cognitives en débat

TABLE DES MATIÈRES

	Page
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
SOMMAIRE	xiv
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1.0 Les trichothécènes	5
1.1 Structures chimiques	5
1.2 Origines des trichothécènes.....	9
1.3 Activités biologiques.....	10
1.4 Faits historiques.....	11
1.5 Effets sur l'agriculture.....	12
1.6 Effets sur la santé humaine et animale	15
1.7 Règlementation.....	17
2.0 Le genre <i>Fusarium</i>	17
2.1 Caractéristiques morphologiques	17
2.2 Relation phylogénétique.....	18
3.0 Biosynthèse des trichothécènes	21
3.1 L'acétate et le mévalonate: précurseurs des trichothécènes	21
3.2 Du mévalonate au composé bicyclique trichodiène	23
3.3 Le trichodiène: premier intermédiaire spécifique dans la biosynthèse.....	25
3.4 Du bicyclique au tricyclique: oxygénations post-trichodiène.....	27
4.0 Cytochromes P450 monooxygénases dans la biosynthèse des trichothécènes.....	34
5.0 Objectifs de cette étude	35

APPROCHE EXPÉRIMENTALE	37
1.0 Listes des produits chimiques.....	38
2.0 Milieux de cultures.....	40
2.1 Milieu PDA	40
2.2 Milieu d'ensemencement	40
2.3 Milieu de production	40
3.0 Culture de <i>Fusarium culmorum</i>	41
4.0 Isolement du 2 α -hydroxytrichodiène	42
4.1 Extraction du milieu de production de <i>F. culmorum</i>	42
4.2 Purification du pic HPLC correspondant au temps de rétention du 2 α -hydroxytrichodiène synthétisé.....	42
4.3 Acétylation du pic HPLC correspondant au temps de rétention du 2 α -hydroxytrichodiène synthétisé.....	43
4.4 Purification du pic HPLC correspondant au temps de rétention du 2 α -acétoxytrichodiène synthétisé	44
5.0 Isolement du 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol.....	45
5.1 Extraction du milieu de production de <i>F. culmorum</i>	45
5.2 Purification du 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol.....	45
5.3 Caractérisation du 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol.....	46
6.0 Purification du substrat [11 α , 11 β - ² H ₂]15- ³ H-trichodiène	46
7.0 Démonstration de l'oxygénation du [11 α , 11 β - ² H ₂]15- ³ H-trichodiène par un extrait cellulaire de <i>F. culmorum</i>	47
7.1 Préparation de l'extrait cellulaire	47
7.2 Essai de l'activité enzymatique	47
7.3 Analyse de la réaction	48
8.0 Localisation intracellulaire de l'activité enzymatique	49
8.1 Préparation des fractions subcellulaires	49
8.2 Essai de l'activité enzymatique	49
8.3 Analyse de la réaction	49
9.0 Effets des cofacteurs sur l'activité enzymatique dans les microsomes	50
9.1 Effets du NADH et NADPH	50
9.2 Effets du FAD et FMN.....	50
9.3 Analyse des essais enzymatiques	50

10.0	Solubilisation des microsomes avec le détergent Brij 35.....	51
10.1	Préparation des microsomes solubilisés.....	51
10.2	Essai de l'activité enzymatique.....	51
10.3	Analyse des essais enzymatiques.....	51
11.0	Détection de hémoprotéines dans les microsomes solubilisés.....	52
11.1	Électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE).....	52
11.2	Coloration du gel à la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB).....	53
12.0	Stabilité thermique de l'activité enzymatique.....	53
13.0	Chromatographie d'affinité des microsomes solubilisés.....	54
14.0	Dosage du contenu protéique.....	55
	RÉSULTATS.....	56
1.0	Isolement, purification et caractérisation du 2 α -hydroxytrichodiène et du 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol.....	57
1.1	2 α -hydroxytrichodiène.....	57
1.2	12,13-Époxy-9,10-trichoène-2-ol.....	63
2.0	Synthèse du substrat.....	64
3.0	Oxygénation du [11 α , 11 β - ² H ₂]15- ³ H-trichodiène par l'extrait cellulaire.....	66
4.0	Localisation intracellulaire de l'activité enzymatique.....	69
5.0	Effets des cofacteurs sur l'activité enzymatique dans les microsomes.....	72
6.0	Solubilisation des microsomes avec le détergent Brij 35.....	74
7.0	Détection d'hémoprotéines dans les microsomes solubilisés.....	74
8.0	Stabilité de l'activité enzymatique contenue dans les microsomes solubilisés.....	77
9.0	Chromatographie d'affinité des microsomes solubilisés.....	79
10.0	Isolement de la monooxygénase catalysant l'hydroxylation en position C-2 du trichodiène chez <i>F. culmorum</i>	81

DISCUSSION.....	83
1.0 Le 2 α -hydroxytrichodiène: premier intermédiaire oxygéné post-trichodiène.....	84
2.0 Le 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol: deuxième intermédiaire oxygéné post-trichodiène	85
3.0 Oxygénation du trichodiène par un système acellulaire.....	86
3.1 Détermination d'une activité d'oxygénation du trichodiène par un extrait cellulaire de <i>F. culmorum</i>	86
3.2 Localisation intracellulaire de l'activité d'oxygénation du trichodiène	87
3.3 Caractérisation de l'enzyme catalysant l'hydroxylation en position C-2 du trichodiène chez <i>Fusarium culmorum</i>	88
CONCLUSION	92
REMERCIEMENTS	95
BIBLIOGRAPHIE.....	96

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1: Effets de l'exposition aux trichothécènes sur les humains et les animaux	16
Tableau 2: Localisation intracellulaire de l'activité enzymatique catalysant l'oxygénation du trichodiène menant au 2 α -hydroxytrichodiène	71
Tableau 3: Effets des cofacteurs sur l'activité d'oxygénation du trichodiène contenue dans les microsomes	73
Tableau 4: Isolement de la monooxygénase catalysant l'hydroxylation en position C-2 du trichodiène chez <i>Fusarium culmorum</i> HLX 1503	82

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1: Structure de base des trichothécènes avec numérotation conventionnelle des carbones et stéréochimie	5
Figure 2: Structure chimique de certains trichothécènes non-macrocycliques	7
Figure 3: Structure chimique de certains trichothécènes macrocycliques	8
Figure 4: Effets de la fusariose sur l'orge et le blé	13
Figure 5: Épi de maïs qui a subi la pourriture fusarienne	14
Figure 6: Macroconidies de <i>Fusarium culmorum</i>	18
Figure 7: Relation phylogénétique des espèces <i>Fusarium</i> déduite par la séquence nucléotidique de l'extrémité 5' de la sous-unité 28S de l'ADNr	20
Figure 8: Première étude de biosynthèse qui a démontré que les trichothécènes étaient formés à partir de trois unités de mévalonate	21
Figure 9: Origine des atomes de carbone dans le 3-acétyldésoxynivalénol provenant du mévalonolactone	23
Figure 10: Mécanisme de cyclisation du farnésyl diphosphate au trichodiène	24
Figure 11: Le trichodiène est le précurseur du 3-acétyldésoxynivalénol et du sambucinol chez <i>Fusarium culmorum</i> et non pas le bazzanène.	27
Figure 12: L'isotrichodermine (ITD) et le 12,13-époxytrichothéc-9-ène (EPT) ont été les remiers intermédiaires tricycliques rigoureusement prouvés dans la biosynthèse du 3-ADN et SOL chez <i>F. culmorum</i>	29
Figure 13: Oxygénations post-trichodiène dans la partie bicyclique de la biosynthèse des trichothécènes	31
Figure 14: Le trichodiol et trichotriol sont respectivement des produits d'isomérisation allylique de l'isotrichodiol et l'isotrichotriol	32
Figure 15: Époxydation du composé semi-synthétique 9 β ,10 β -époxytrichodiène dans un extrait cellulaire de <i>F. culmorum</i>	33
Figure 16: Équation générale de monooxygénation par les cytochromes P450	35

Figure 17:	Chromatogramme de l'extrait cellulaire (233 mg) de <i>F. culmorum</i> fractionné avec le HPLC préparatif	58
Figure 18:	Chromatogramme de la région 49 à 60 min collectée au HPLC préparatif fractionnée avec le HPLC semi-préparatif	59
Figure 19:	Réaction d'acétylation du 2 α -hydroxytrichodiène avec le [1'- ¹⁴ C]anhydride acétique	60
Figure 20:	Chromatogramme de la réaction d'acétylation du pic à 55,8 min provenant du HPLC semi-préparatif fractionnée avec le HPLC analytique	62
Figure 21:	Bioscan du 2 α -[1'- ¹⁴ C]-acétoxytrichodiène provenant de l'acétylation du 2 α -hydroxytrichodiène avec le [1'- ¹⁴ C]anhydride acétique	63
Figure 22:	Structure chimique du métabolite 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol isolé	64
Figure 23:	Bioscan du substrat [11 α , 11 β - ² H ₂]15- ³ H-trichodiène synthétisé	65
Figure 24:	Profil au HPLC analytique de la réaction d'oxygénation par l'extrait cellulaire	68
Figure 25:	Électrophorèse en gel de polyacrylamide natif 8% des microsomes solubilisés	76
Figure 26:	Stabilité de l'activité de monooxygénation par les microsomes solubilisés entreposés à une température de 4-6°C	78
Figure 27:	Chromatographie d'affinité des microsomes solubilisés avec la colonne 2',5'-ADP Sépharose 4B	80

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-ADN :	3-Acétaldésoxynivalénol
ADNr :	Acide désoxyribonucléique ribosomal
2',5'-ADP :	Adénosine 2',5'-diphosphate
2'AMP :	Adénosine 2'-monophosphate
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomal
BZN :	Bazzanène
°C :	Degré(s) Celcius
cm :	Centimètre(s)
DON :	Désoxynivalénol
DTT :	Dithiothréitol
EDTA :	Acide éthylènediamine tétraacétique
EPT :	12,13-époxytrichothéc-9-ène
FAB-MS :	Spectroscopie de masse par bombardement rapide des atomes
FAD :	Flavine adénine dinucléotide
FMN :	Flavine mononucléotide
FPLC :	Chromatographie liquide rapide à protéine
FPP :	Farnésyl diphosphate
g :	Gramme(s)
HPLC :	Chromatographie liquide à haute pression
HPTLC :	Chromatographie sur couche mince haute performance
hre :	Heure(s)
IgA :	Immunoglobuline A

ITD :	Isotrichodermine
kDa :	Kilodalton(s)
L :	Litre(s)
µg :	Microgramme(s)
µl :	Microlitre(s)
µM:	Micromolaire(s)
M :	Molaire(s)
mC :	Millicurie(s)
mg :	Milligramme(s)
ml :	Millilitre(s)
mm :	Millimètre(s)
mM :	Millimolaire(s)
mmole :	Millimoles(s)
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
(3R)-NPP :	(3R)-Nérolidyle diphosphate
PAGE :	Électrophorèse en gel de polyacrylamide
PMSF :	Fluoride de phénylméthylsulfonyle
ppm :	Partie(s) par million
R _f :	Rapport frontal
RFLP :	Polymorphisme de la longueur des fragments de restriction
RMN :	Résonance magnétique nucléaire

rpm :	Révolution(s) par minute
t_R :	Temps de rétention
TDN :	Trichodiène
TMB :	3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine
UV :	Ultraviolets

SOMMAIRE

La moisissure *Fusarium culmorum* est reconnue pour la contamination de récoltes céréalières et la production de trichothécènes nuisibles à la santé des humains et des animaux. Une des méthodes possible pour contrôler ou prévenir la production biologique de ces mycotoxines est d'inhiber la première oxygénation du trichodiène; le premier intermédiaire spécifique à leur biosynthèse. Pour ce faire, l'objectif majeur de cette étude était d'isoler le 2 α -hydroxytrichodiène comme métabolite naturel chez cette espèce et d'isoler la monooxygénase catalysant la première oxygénation.

La technique d'acétylation avec [1'-¹⁴C]anhydride acétique et l'utilisation du composé synthétisé a permis d'isoler et de purifier pour la première fois le 2 α -hydroxytrichodiène à partir d'un extrait du milieu de production de *F. culmorum*. De plus, le 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol qui est un précurseur connu des trichothécènes a été isolé et purifié pour la première fois directement à partir de ce milieu. Afin de déterminer l'activité enzymatique de l'oxygénation du trichodiène, le [11 α , 11 β -²H₂]15-³H-trichodiène synthétisé par Marie-Claude Rousseau était nécessaire. Un test enzymatique, dépendant du NADPH et non du NADH, a démontré que l'oxygénation du trichodiène menant au 2 α -hydroxytrichodiène était retrouvée dans les microsomes. De plus, l'ajout de FMN 10 μ M / FAD 10 μ M dans les microsomes doublait l'activité, puis celle-ci était augmentée d'un facteur 2 par la solubilisation des microsomes avec une concentration finale de 0,17% du détergent Brij 35. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec une coloration au 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine / H₂O₂ a révélé la présence d'une bande bleue dans les microsomes ce qui correspond à la présence de noyaux hème. L'utilisation d'une colonne d'affinité 2',5'-ADP-Sépharose 4B n'a pas permis de récupérer l'activité de l'enzyme, ce qui laisse supposer que la réductase s'est détachée du cytochrome P450. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'oxygénation du trichodiène soit catalysée par une cytochrome P450 monooxygénase contenant un domaine FAD et FMN.

Introduction

Les trichothécènes sont des sesquiterpènes toxiques produits, entre autres, par plusieurs espèces de la moisissure *Fusarium*. Ces mycotoxines nuisent à la santé des humains et des animaux par leur propriété à causer une vomitoxicose. Le trichothécène désoxynivalénol, ou vomitoxine, en est responsable. Durant la deuxième guerre mondiale en Union Soviétique, les trichothécènes ont causé une maladie très grave, soit l'aleucie alimentaire toxique. En fait, 10% de la population du district Orenburg près de la Sibérie en est décédé. Des allégations font état de leur utilisation comme arme chimique durant les guerres du Viêt-nam et du Golfe Persique.

Ces moisissures sont reconnues pour leur contamination du blé, de l'orge, du maïs et du malt au Canada ainsi que dans le nord des États-Unis. Les conséquences d'une telle contamination sont nombreuses au point de vue économique. Les producteurs agricoles essuient de lourdes pertes financières, tout comme l'industrie de la transformation, qui se charge alors d'importer ces céréales. Une des approches afin de contrôler ou de prévenir ce problème serait de bloquer la production biologique de ces métabolites toxiques. Ainsi, la meilleure stratégie envisagée serait d'inhiber les premières réactions enzymatiques impliquées dans la biosynthèse des trichothécènes. Cependant, l'enzymologie de la biosynthèse des trichothécènes n'est pas très bien connue.

Dans notre laboratoire, plusieurs des intermédiaires impliqués dans la biosynthèse des trichothécènes ont été isolés chez *Fusarium culmorum* et leur rôle élucidé. Le 3-acétyldésoxynivalénol est un des métabolites majeurs produits par cette espèce. Le premier précurseur spécifique à sa biosynthèse est le trichodiène qui subit, entre autres, sept oxygénations séquentielles afin de mener au métabolite final. Les oxygénations de ce type sont généralement catalysées par des cytochromes P450 monooxygénases chez les eucaryotes dont la presque totalité sont des protéines intégrées à la membrane du réticulum endoplasmique.

Récemment, le 2 α -hydroxytrichodiène a été démontré comme précurseur des trichothécènes chez *F. culmorum* dans notre laboratoire. Celui-ci semble être le premier

intermédiaire post-trichodiène oxygéné dans la biosynthèse. Cependant, cet intermédiaire n'a pas encore été isolé à cause de son infime accumulation dans le milieu de culture.

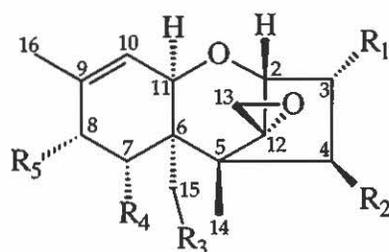
Le premier objectif de cette étude était d'isoler le 2 α -hydroxytrichodiène comme métabolite naturel afin de soutenir son implication dans la biosynthèse démontrée par l'étude précédente. Le deuxième objectif était de démontrer l'existence d'une activité enzymatique catalysant l'oxygénation sur le carbone 2 du trichodiène afin de former le 2 α -hydroxytrichodiène dans un extrait cellulaire de *F. culmorum*. Finalement, le dernier objectif était d'isoler cette monooxygénase afin de la caractériser le plus possible.

Revue Bibliographique

1.0 Les trichothécènes

1.1 Structures chimiques

Les mycotoxines trichothécènes sont un groupe de sesquiterpènes naturels ayant, pour la majorité, une structure de base (Figure 1) tricyclique possédant une fonction époxyde aux carbones 12 et 13 (C-12 et C-13) et une double liaison entre C-9 et C-10 qui la caractérisent ainsi comme 12,13-époxytrichothéc-9-ène (EPT). Les structures de plus de 148 trichothécènes naturels sont connues (Rotter et Prelusky, 1996) et diffèrent de la structure de base par des fonctions oxygènes, principalement alcool, cétone et ester. Elles peuvent se retrouver en position C-3, C-4, C-7, C-8, et C-15 dans une variété de combinaisons et avec une stéréochimie particulière propre à chaque position (Figure 1).



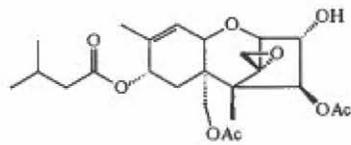
12,13-Époxytrichothéc-9-ène

Figure 1 : Structure de base des trichothécènes avec numérotation conventionnelle des carbones et stéréochimie (R₁₋₅ : fonctions possibles).

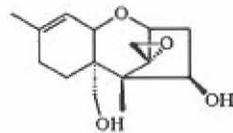
Les trichothécènes ont été divisés en deux classes (Jarvis, 1991): non-macrocyclique (Figure 2) et macrocyclique (Figure 3). La première contient deux sous-classes selon la présence ou non d'une fonction cétone en position C-8, soit les trichothécènes du type B et type A respectivement (Ueno, 1980). Dans le type A, on retrouve entre autres, la toxine T-2, le verrucarol, le néosolaniol, et le diacétoxyscirpénol, tandis que dans le type B on retrouve entre autres, le 3-acétyldésoxynivalénol (3-ADN), le

désoxynivalénol (DON), la fusarénone X, et le trichothécine. En plus, une troisième sous-classe contient des trichothécènes modifiés tels que le sambucinol (SOL), le sambucain, l'apotrighodiol et le sporol. Quant à la deuxième classe, les trichothécènes macrocycliques sont structurellement plus complexes, c'est-à-dire qu'ils ont la caractéristique de posséder un macrocycle estérifié de structure variable via les fonctions alcools en C-4 et C-15 des trichothécènes. Ils ont été divisés en deux sous-classes générales, soit les verrucarins C27 et les roridins C29. Dans la première, on retrouve par exemple, le verrucarin A et J, tandis que dans la deuxième on retrouve la satratoxine H, la roritoxine C, le baccharionoid B7, et le roridin D.

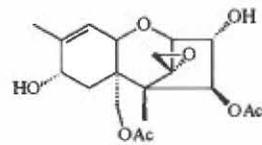
TYPE A



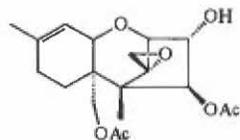
Toxine T-2



Verrucarol

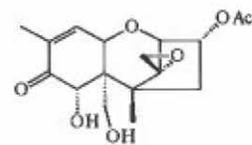


Néosolaniol

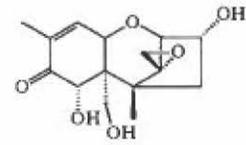


Diacétoxyscirpérol

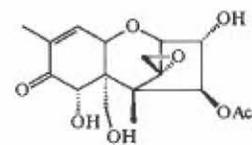
TYPE B



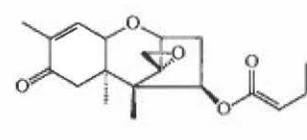
3-Acétaldéhydeoxyvalérol



Déoxyvalérol

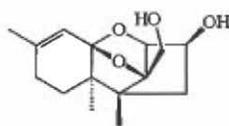


Fusarénone X

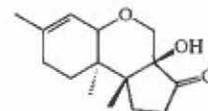


Trichothécine

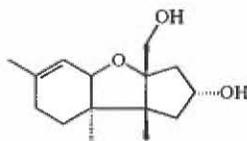
MODIFIÉS



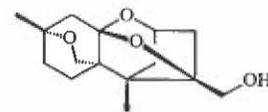
Sambucinol



Sambucoïne



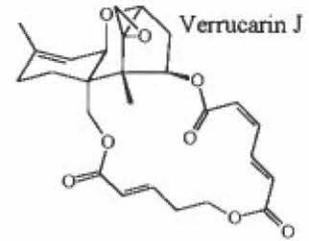
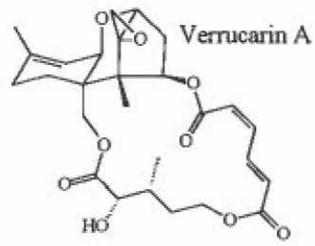
Apotrichodiol



Sporol

Figure 2: Structure chimique de certains trichothécènes non-macrocycliques.

VERRUCARINS C27



RORIDINS C29

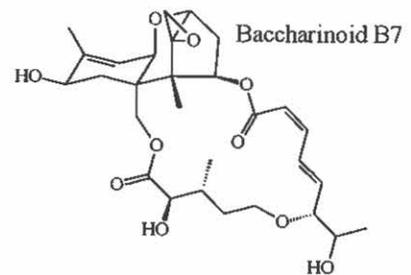
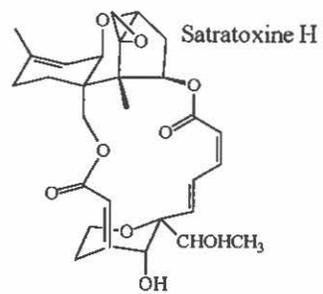
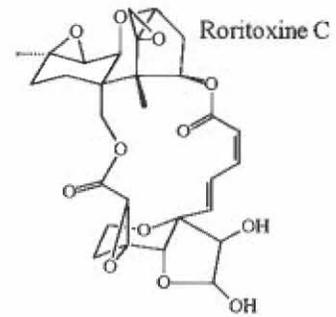
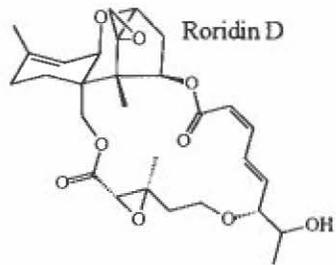


Figure 3: Structure chimique de certains trichothécènes macrocycliques.

1.2 Origines des trichothécènes

Ces mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par certaines espèces de champignons filamenteux du genre *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cylindrocarpon*, *Cephalosporium*, et *Verticimonosporium* (Ueno, 1980; Sharma et Kim, 1991; Jarvis, 1991a). Les trichothécènes non-macrocycliques sont produits majoritairement par plusieurs espèces du genre *Fusarium*, tandis que les macrocycliques sont produits en grande partie par *Myrothecium roridum*, *M. verrucaria* et *Stachybotrys atra*.

Il est intéressant de noter que des trichothécènes macrocycliques ont été retrouvés chez deux arbustes du Brésil de la famille asteraceae, soit *Baccharis megapotamica* et *B. coridifolia* (Boldt, 1989; Jarvis *et al.*, 1991b), ainsi que chez un autre arbuste du même genre en Argentine, soit *B. artemisioides* (Rizzo *et al.*, 1997). Des études précédentes ont suggéré que la présence des trichothécènes macrocycliques chez les espèces *Baccharis* était due à une relation commensale entre la plante et une espèce *Myrothecium* non-identifiée (Jarvis *et al.*, 1981). Des évidences récentes suggèrent que la plante elle-même peut biosynthétiser ces antibiotiques (Jarvis *et al.*, 1991b) ou qu'ils sont les produits d'un champignon endophyte (Rizzo *et al.*, 1997).

La toxine T-2 et le désoxynivalénol (et 3-ADN) sont les deux trichothécènes sur lesquels les efforts de recherche ont été les plus concentrés (Rotter *et al.*, 1996). Les trichothécènes, 3-acétyldésoxynivalénol et sambucinol, ont été démontrés comme produits majoritaires chez *Fusarium culmorum* (Greenhalgh *et al.*, 1984; Mohr *et al.*, 1984). La toxine T-2 a été isolée comme produit majoritaire chez *F. sporotrichioides* (Marasas *et al.*, 1984). Le désoxynivalénol a été retrouvé, entre autres, chez *F. graminearum* (Miller *et al.*, 1983) et *F. culmorum* (Greenhalgh *et al.*, 1986). Par ailleurs, une multitude d'autres trichothécènes sont produits pour chacune de ces espèces sous différentes conditions de culture.

1.3 Activités biologiques

Les trichothécènes possèdent de nombreuses propriétés toxiques et médicinales. La plus importante de celles-ci est l'inhibition de la synthèse protéique chez les cellules eucaryotes (Wei et McLaughlin, 1974). Les trichothécènes peuvent aussi être antileucémique (Hughes et al., 1989), anticancer (Jarvis et Acierto, 1989), antifongique (Sugawara *et al.*, 1997), antiprotozoaire (Nishie *et al.*, 1989), phytotoxique (Cutler, 1988), et antiviral (Tani *et al.*, 1995). L'activité inhibitrice des trichothécènes requiert la présence intacte de la 9,10-double liaison et la fonction 12,13-époxyde (Ehrlich et Daigle, 1987). Ces mycotoxines se fixent sur la sous-unité 60S des ribosomes eucaryotes et interfèrent dans l'activité de la peptidyltransférase qui est impliquée dans l'élongation et la terminaison de la synthèse des protéines (Feinberg et McLaughlin, 1989). Il est intéressant de noter que les trichothécènes non-macrocycliques se fixent de façon réversible aux ribosomes tandis que ceux macrocycliques se fixent irréversiblement, mais la base chimique de cette différence n'est pas connue (Hernandez et Cannon, 1982). La fonction 12,13-époxyde est reconnue pour être essentielle à la toxicité des trichothécènes. En effet, la dé-époxydation est un mécanisme de détoxification chez les mammifères (Lake *et al.*, 1987; Yoshizawa *et al.*, 1983). De plus, la microflore gastrointestinale de cochons et de vaches a aussi montré sa capacité à dé-époxyder le DON (Hedman et Pettersson, 1997).

Étant donné que les structures des ribosomes sont hautement conservées à travers l'évolution, il est compréhensible que tous les eucaryotes soient virtuellement sensibles aux trichothécènes. Or, les organismes produisant ces trichothécènes sont insensibles à ceux-ci, et il a été démontré qu'une modification du site de fixation de leurs ribosomes pouvait être la stratégie employée comme mécanisme de défense (Hobden et Cundliffe, 1980). Récemment, une étude a démontré pour la première fois que la méthylation des ribosomes est le mécanisme de résistance utilisé chez ces organismes producteurs de trichothécènes, similaire à celui observé chez les procaryotes produisant des antibiotiques (Iglesias et Ballesta, 1994).

1.4 Faits historiques

Durant la deuxième guerre mondiale en Russie, et ce jusqu'en 1947, les trichothécènes ont été la cause d'une maladie très grave, soit l'aleucie alimentaire toxique. En fait, 10% de la population du district Orenburg près de la Sibérie en est décédé (Ueno, 1983). Cette maladie, qui est une diminution des leucocytes sanguins, a été associée à une consommation de grains infectés par *F. sporotrichioides*, une espèce produisant la toxine T-2, qui est le trichothécène le plus toxique. En Chine, le comté de Linxian situé dans la province de Henan est reconnu pour être une région où l'incidence du cancer de l'œsophage est élevée. Ainsi, des études ont établi un lien entre ce cancer et la présence élevée de trichothécènes chez le maïs et le blé de cette région (Hsia *et al.*, 1988; Luo *et al.*, 1990).

L'aspect le plus controversé de l'exposition des humains aux trichothécènes a été l'allégation, au début des années 1980, quant à leur utilisation comme arme chimique durant la guerre du Viêt-nam (Mirocha *et al.*, 1983; Spyker et Spyker, 1983). Ainsi, le largage de particules jaunes, provenant d'avions volant à basse altitude, sur les populations civiles du Laos (1975-81), du Cambodge (1979-1981) et de l'Afghanistan (1979-81) a été nommé "Yellow-Rain". Une estimation du nombre de victime a été de 6300 au Laos, 1000 au Cambodge, et 3042 en Afghanistan (U.S. Army, 1996). Cependant, cette question a été très controversée et demeure encore aujourd'hui sans réponse définitive (Ashton *et al.*, 1983; Maddox, 1984).

Par ailleurs, durant la guerre du Golfe Persique en 1991, des troupes américaines postées au port de Al Jubayl dans le nord de l'Arabie Saoudite ont subi une attaque de la part des Iraquiens. La présence d'une poudre jaune recouvrait la zone attaquée et semblait contenir des trichothécènes (Eddington, 1997; Tucker, 1997). Ainsi, le "Gulf War Syndrome" aurait pu être causé, en partie, par l'exposition des soldats américains aux trichothécènes. Tout comme le "Yellow Rain", la controverse persiste toujours.

1.5 Effets sur l'agriculture

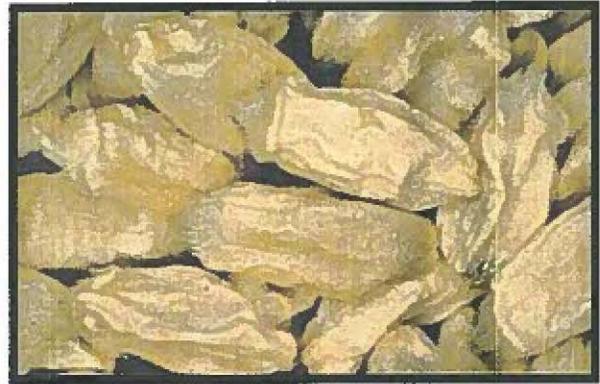
Annuellement, environ 25% des récoltes alimentaires mondiales sont affectées par les mycotoxines (Casteel et Braun, 1992). La fusariose des épis du blé et la pourriture fusarienne de l'épi de maïs sont d'importantes maladies redoutées par les agriculteurs du monde entier. Elles sont causées par *F. culmorum*, *F. crookwellense*, et *F. graminearum*. Ce dernier est le plus répandu dans l'est du Canada (Ouellet *et al.*, 1998).

Chez le blé, la fusariose est caractérisée par des grains d'apparence blanche crayeuse mince et échaudée. La tête infectée peut devenir partiellement ou totalement blanche comparativement au vert observé normalement (Figure 4C). Les grains fusariés, qui sont aussi appelés grains momifiés (Figure 4B), portent des moisissures blanches ou rosées fibreuses au niveau du sillon et parfois du germe. Chez l'orge, les grains fusariés comportent des incrustations de moisissure rose, orange ou noire (Figure 4A). La tête infectée peut avoir une apparence brune ce qui caractérise les brûlures fusariennes (Figure 4D). La fusariose s'attaque plus fréquemment au blé mais peut également affecter l'orge, l'avoine, le seigle, le maïs, l'alpiste des Canaries et les graminées fourragères.

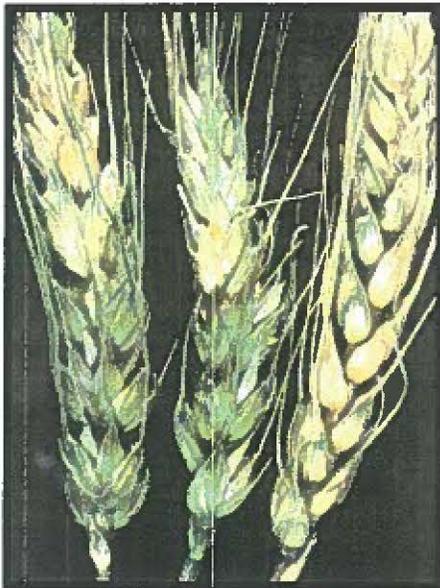
Quant à la pourriture fusarienne de l'épi de maïs, elle est caractérisée par la présence de moisissure de couleur rose ou saumon tandis que l'épi peut avoir une apparence brune ou avoir des rayures blanches (Figure 5). Sous certaines conditions atmosphériques, la fusariose et la pourriture fusarienne peuvent produire des mycotoxines, dont la plus courante est le DON. Ces conditions favorables incluent une température fraîche et humide spécialement durant la moisson. La production de trichothécènes peut même se produire à des températures avoisinant le point de congélation. La croissance de ces moisissures et la production de mycotoxines ont même été remarquées durant le processus de germination pendant le maltage dans la fabrication de la bière (Schwarz *et al.*, 1995). Par conséquent, le DON a été retrouvé à une fréquence élevée dans les bières canadiennes et européennes, avec des concentrations > 200 ng/ml chez des bières allemandes (Scott, 1996).



A) Grains d'orge fusariés montrant les incrustations oranges ou noires sur leur surface.



B) Grains de blé fusariés montrant une apparence momifiée.



C) Fusariose du blé montrant des têtes partiellement infectées avec les grains blancs (gauche et centre) et une tête totalement infecté (droite).



D) Fusariose de l'orge montrant des têtes infectées avec les grains bruns.

Figure 4: Effets de la fusariose sur l'orge et le blé.

- A) <http://www.gov.mb.ca/agriculture/diseases/images/fac12s03.jpg>
- B) <http://www.gov.mb.ca/agriculture/diseases/images/fac12s04.jpg>
- C) <http://www.ext.nodak.edu/extpubs/plantsci/smgrains/pp804-1.gif>
- D) <http://www.ext.nodak.edu/extpubs/plantsci/smgrains/pp804-4.gif>



<http://www.ent.iastate.edu/images/planpath/corn/fusarium/1355.42fusariumearrot.jpg>

Figure 5: Épi de maïs qui a subi la pourriture fusarienne.

1.6 Effets sur la santé humaine et animale

Il existe de nombreuses raisons de craindre la présence de ces trichothécènes dans les récoltes servant à la production de nourriture et de moulé. En plus de diminuer la valeur commerciale des récoltes, ils sont toxiques pour les humains et le bétail qui ingèrent des céréales contaminées. La toxicité relative des trichothécènes du type A tel que la toxine T-2, et ceux du type B tel que le DON, a été étudiée chez plusieurs systèmes cellulaires et animaux. En général, ceux du type A sont plus toxiques que ceux du type B. Par exemple, la toxine T-2 est considérée comme la plus toxique comparativement au 3-ADN. Ainsi, cette différence est de 1 300 fois pour les cellules Vero (Thompson et Wannemacher, 1986), 23 000 fois pour les cellules MIN-GL1, 2 000 fois pour les cellules K-562 (Visconti *et al.*, 1991), et 1 500 fois pour les cellules BHK-21 (Rotter *et al.*, 1993). Les effets sur la santé des êtres humains et des animaux peuvent être divers et nombreux selon le type et la durée de l'exposition aux trichothécènes tel que l'ingestion, le contact cutané, ou l'inhalation. La concentration présente influence aussi les réactions des sujets (Casteel et Braun, 1992; U.S. Army, 1996). Une description détaillée des effets toxiques est présentée dans le Tableau 1.

L'ingestion de faibles concentrations de trichothécènes cause une réduction de la consommation de nourriture tandis que la l'ingestion d'une dose plus élevée induit des vomissements, c'est-à-dire une vomitoxicose (Rotter et Prelusky, 1996). Le responsable de cette maladie est le trichothécène DON, mieux connu sous le nom de vomitoxine produit par plusieurs espèces du genre *Fusarium*. Il est le contaminant le plus répandu mondialement dans les récoltes agricoles et un composé très stable durant l'entreposage et la préparation industrielle de nourriture. De plus, il ne se dégrade pas à de hautes températures. Ainsi, la contamination fréquente des récoltes combinée à la résistance au processus industriel de transformation, rend les trichothécènes persistant dans la nourriture pour des humains et pour des animaux.

Tableau 1: Effets de l'exposition aux trichothécènes sur les humains et les animaux

HUMAINS	ANIMAUX
Douleur peau	Refus nourriture
Démangeaison	Diarrhée
Rougeur	Vomissement
Nécrose cutanée	Dermatite
Douleur nez et langue	Hémorragie
Écoulement nasal	Détérioration muqueuses
Éternuement	Nécrose museau
Toux	Diminution production lait et oeufs
Essoufflement	Diminution performance reproduction
Respiration sifflante	Mort
Douleur thoracique	
Hémoptysie	
Prostration	
Ataxie	
Collapsus	
État de choc	
Mort	

Les trichothécènes causent plusieurs effets sur le système immunitaire (Rotter *et al.*, 1996). Ils peuvent être immunosuppresseurs ou immunostimulateurs (selon la dose et la durée d'exposition), superinduire la production de cytokines par les cellules T auxiliaires, et activer les macrophages et les cellules T à produire un courant proinflammatoire de cytokines. De plus, ils causent un dérèglement de la production d'immunoglobuline A (IgA) très similaire à celui de la néphropathie IgA chez les humains (glomérulonéphrite la plus commune dans le monde) (D'Amico, 1987). D'autre part, le système hématologique a été mentionné comme cible des trichothécènes pour induire des désordres tels que la neutropénie, la thrombopénie, et l'anémie aplastique chez les humains et les animaux (Rio *et al.*, 1997). Récemment, le fusarénon-X et la toxine T-2 ont démontré leur capacité à induire l'apoptose chez des souris (Islam *et al.*, 1998; Miura *et al.*, 1998).

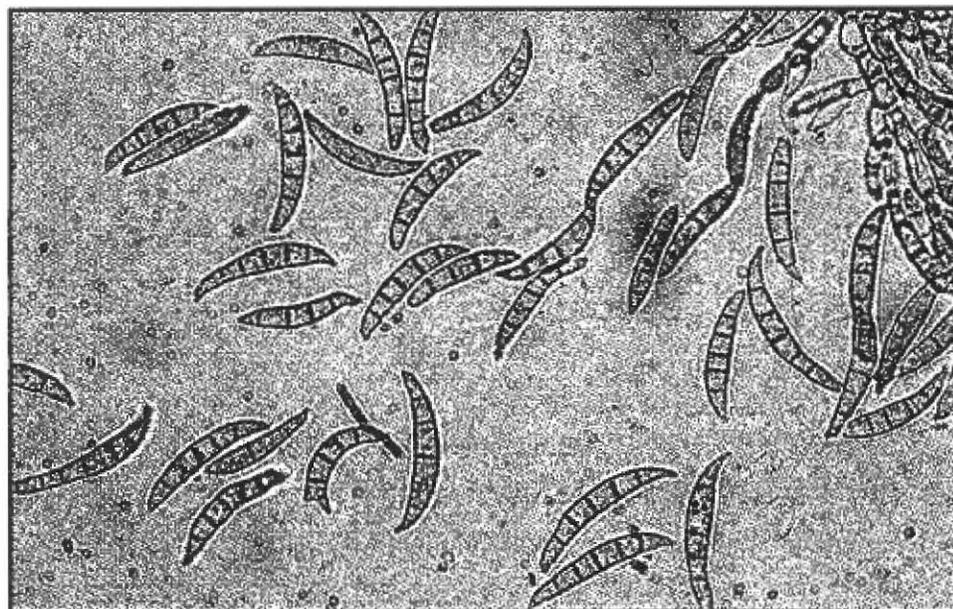
1.7 Règlementation

Au Canada, la concentration de DON est limitée à 2 parties par million (ppm) dans le blé tendre blanc non nettoyé employé dans les aliments pour adultes, et à 1 ppm dans les produits alimentaires pour bébés (Kuiper-Goodman, 1985). Par ailleurs, la consommation quotidienne de DON tolérable est estimée à 3,0 µg/kg et 1,5 µg/kg de masse corporelle pour les adultes et les enfants respectivement. Les États-Unis ont établi une tolérance limite de 1 ppm en ce qui concerne les produits finis à base de céréales pour la consommation humaine (Trucksess *et al.*, 1995). Pour les ingrédients destinés aux poules ainsi qu'au bétail âgé de 4 mois et plus, la concentration limite de DON est de 10 ppm mais ces aliments ne doivent pas composer plus de 50% de leur diète. Pour les porcs, animaux les plus sensibles aux trichothécènes, la limite est établie à 5 ppm. Cependant, leur consommation d'aliments constitués de DON doit être au maximum de 20%. Finalement, la limite est de 5 ppm (sans dépasser 40% de la diète) pour les aliments destinés aux autres animaux.

2.0 Le genre *Fusarium*

2.1 Caractéristiques morphologiques

Le genre *Fusarium*, officiellement classé dans les deutéromycètes, appartient aux hyphomycètes (ou moisissures) et est maintenant considéré comme un genre anamorphe qui se rapporte aux hypocréales (ascomycètes). Les *Fusarium* sont caractérisés par la production de conidies visqueuses, hyalines, cloisonnées, en forme de canots connues sous le nom de macroconidies et qui sont formées dans des structures fructifères appelées sporodochies. Peu d'espèces produisent des microconidies dans le mycélium aérien. Ainsi, selon l'espèce et/ou l'environnement, un ou l'autre peut dominer sur un substrat naturel. Certaines espèces produisent aussi des chlamydospores (Seifert, 1996). Chez *Fusarium culmorum*, les macroconidies sont courtes et larges (habituellement plus larges au-dessus du centre de la spore) et souvent à cellules basales passablement arrondies (Figure 6).



<http://grain.jouy.inra.fr:80/dbs/graingenes/externalFiles/fjz064d.gif>

Figure 6: Macroconidies de *Fusarium culmorum*.

Parce qu'il est nécessaire d'observer toutes ces structures anamorphiques pour identifier une espèce de *Fusarium* avec certitude, la plupart des taxonomies modernes des *Fusarium* sont basées sur des caractères cultureux. La taxonomie complexe du genre *Fusarium* a mené à de nombreuses confusions et mauvaises identifications des espèces produisant les trichothécènes, mais la plupart de ces erreurs ont été corrigées. Ainsi, les ouvrages de Nelson et ses collaborateurs représentent le système le plus compréhensible et le plus largement utilisé pour l'identification des espèces du genre *Fusarium* (Marasas *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1983).

2.2 Relation phylogénétique

La venue des techniques de biologie moléculaire a permis de faciliter l'identification des espèces chez *Fusarium*. Généralement, les relations phylogénétiques entre des groupes d'organismes sont déterminées par comparaison de séquences de l'acide désoxyribonucléique ribosomal (ADNr). Des arbres phylogénétiques partiels, pour des

espèces de *Fusarium* et des champignons apparentés à ce genre, ont été construits par comparaison des séquences nucléotidiques de l'extrémité 5' de la sous-unité 28S de l'acide ribonucléique ribosomal (ARNr) (Guadet *et al.*, 1989; Bruns *et al.*, 1991; O'Donnell, 1993). Le séquençage de l'ADNr est la principale technique pour résoudre la taxonomie de *Fusarium* (Manicom *et al.*, 1990). Cependant, les comparaisons indirectes de séquences par analyse en polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP), n'ont pas permis de diviser en sections taxonomiques selon les caractéristiques morphologiques chez les espèces *Fusarium* (Bateman *et al.*, 1996). La classification d'espèces en sections est un moyen adéquat de regrouper les espèces possédant des caractéristiques morphologiques similaires. Toutefois, il est maintenant connu que cette méthode ne permet pas d'établir de réelles relations phylogénétiques.

Récemment, une analyse de séquences d'ADNr dans une région variable de l'extrémité 5' de la sous-unité 28S de l'ADNr (provenant de plusieurs espèces de *Fusarium*) a permis d'établir une relation phylogénétique (Figure 7) entre ces espèces et le type de trichothécène qu'ils produisent (Mulè *et al.*, 1997). En effet, toutes les souches produisant ces mycotoxines ont été regroupées et deux groupes monophylétiques ont été identifiés selon la présence ou non d'une fonction cétone à la position C-8 des trichothécènes qu'ils produisent, c'est-à-dire les trichothécènes de type A ou B. Ainsi, cette étude a démontré que des relations phylogénétiques chez les espèces basées sur l'ADNr correspondaient mieux avec les métabolites secondaires produits que le système de classification habituel basé sur la morphologie.

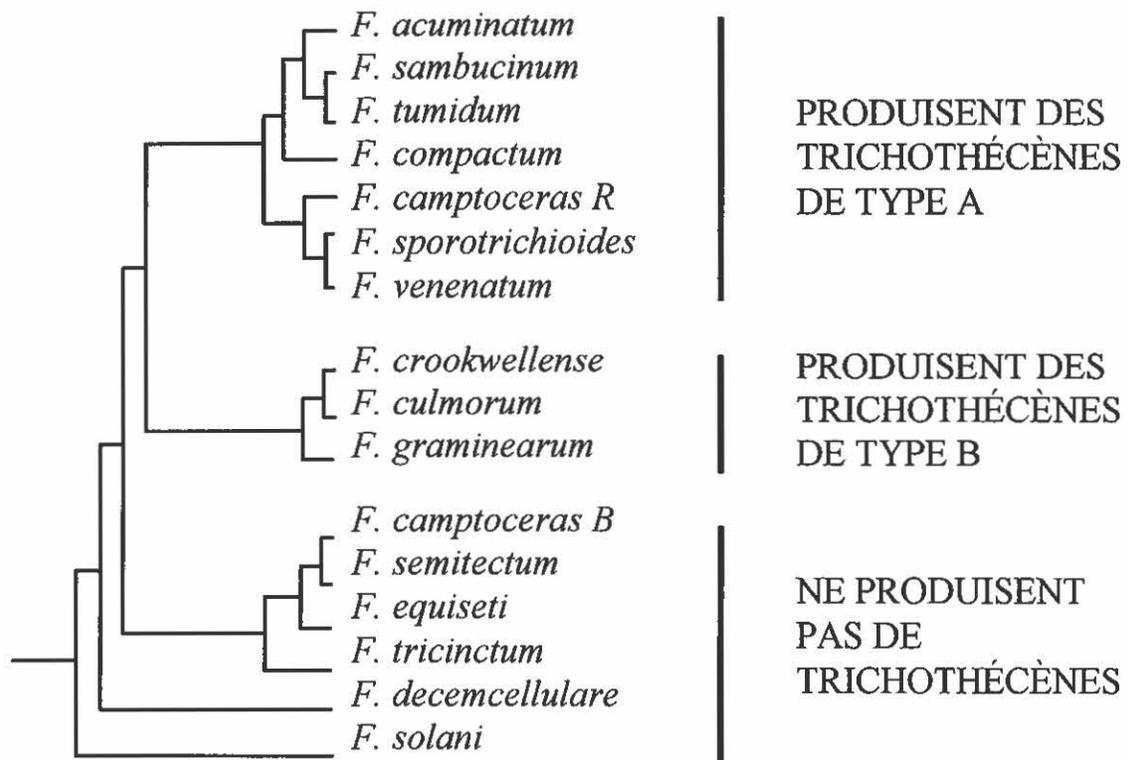


Figure 7: Relation phylogénétique des espèces *Fusarium* déduite par la séquence nucléotidique de l'extrémité 5' de la sous-unité 28S de l'ADNr (Mulè *et al.*, 1997).

La structure du trichothécine utilisée par Fishman *et al.* (1959) ainsi que Jones et Lowe (1960) lors de leur étude était incorrecte. La radioactivité provenant du [2-¹⁴C]mévalonate était distribuée en positions C-4, C-14, et C-10, or Achilladelis *et al.* (1970) puis Machida et Nozoe (1972b) ont plutôt déterminé que la radioactivité se retrouvait aux positions C-4, C-14, et C-8 (Figure 8). Hanson *et al.* (1974) ont alimenté *T. roseum* avec du [2-¹³C]mévalonate et isolé le trichothécine. Avec le spectre résonance magnétique nucléaire (RMN) du ¹³C obtenu, un enrichissement a été observé seulement aux positions C-4, C-8, et C-14 confirmant ainsi sans équivoque les résultats de Achilladelis *et al.* (1970) puis ceux de Machida et Nozoe (1972b), et prouvant définitivement la nature des trichothécènes en tant que sesquiterpènes. Ils ont aussi démontré que le farnésyl diphosphate (FPP), obtenu par la condensation de trois unités de mévalonate, était un intermédiaire dans la biosynthèse des trichothécènes. La cyclisation du FPP impliquait trois déplacements. Un premier déplacement -1,4 de l'hydrure de la position C-6 à C-10 du FPP a été prouvé pour la première fois par le groupe de Hanson (Achilladelis *et al.*, 1970; Achilladelis *et al.*, 1972; Adams et Hanson, 1971) ainsi que par Arigoni *et al.* (1973). De plus, deux déplacements -1,2 des méthyles où le groupement méthyle en position C-2 du mévalonate migre à la position C-7 causant ainsi la seconde migration de C-7 à C-6 a été prouvé pour la première fois par Adams et Hanson (1970), Achilladelis *et al.* (1970), Achilladelis *et al.*, (1972).

Des expériences d'alimentation avec du [1-¹³C]acétate, [2-¹³C]acétate, et [1,2-¹³C₂]acétate chez *T. roseum* ont démontré que les 15 carbones des trichothécènes provenaient tous de l'acétate (Dockfrill *et al.*, 1978; Riisom *et al.*, 1978). L'origine des atomes de carbone du 3-ADN chez *F. culmorum* dérivant du mévalonolactone (Figure 9) a été démontrée dans notre laboratoire par une expérience d'alimentation avec du [2,4-¹³C₂]mévalonolactone (Zamir *et al.*, 1987b). De plus, le déplacement -1,2 des méthyles a été prouvé avec l'utilisation du [4,6-¹³C₂]mévalonolactone dont un couplage direct entre le C-6 et le C-15 du 3-ADN a démontré ce déplacement impliquant le transfert du C-6 à C-4 du mévalonolactone (Zamir, 1986).

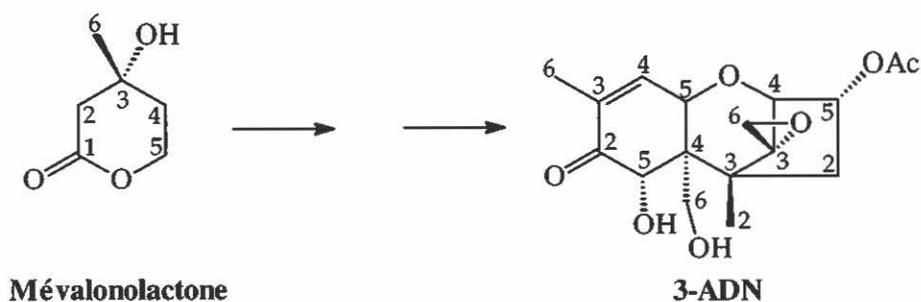


Figure 9: Origine des atomes de carbone dans le 3-acétyldésoxynivalénol provenant du mévalonolactone.

3.2 Du mévalonate au composé bicyclique trichodiène

La première partie de la biosynthèse des trichothécènes, du mévalonate au trichodiène, a été longuement étudiée et par conséquent très connue. Elle implique la condensation de trois molécules de mévalonate en FPP et la cyclisation de ce dernier en trichodiène. De nombreuses études réalisées par le groupe de Cane ont porté sur le mécanisme de cyclisation du FPP (Figure 10) (Cane *et al.*, 1985, 1990, 1992; Cane et Ha, 1988). Elles ont démontré que le FPP subit une première ionisation suivie d'un réarrangement afin de mener à l'isomère allylique tertiaire, (3*R*)-nérolidyle diphosphate (3*R*)-NPP. Une deuxième ionisation et la cyclisation électrophilique mènent au cation bisabolyle qui implique la double liaison centrale. Ensuite, une cyclisation du cation bisabolyle couplée à un déplacement $-1,4$ de l'hydrure donne l'intermédiaire **6**, duquel deux déplacements consécutifs $-1,2$ des méthyles et une déprotonation mènent ultimement à la formation du trichodiène. Plusieurs expériences supportent l'implication du (3*R*)-NPP incluant les observations de la cyclisation du FPP. Cette dernière se produit sans la perte de l'un ou l'autre des protons attachés au C-1 et avec une nette rétention de configuration à ce centre (Cane *et al.*, 1985). De plus, l'utilisation du (3*R*)-NPP comme substrat par la trichodiène synthase (Cane et Ha, 1988) et l'incubation du 6,7-dihydro-FPP

avec la trichodiène synthase ont résulté en la formation de produits de cyclisations oléfiniques et alcooliques avortés dont le (3*R*)-6,7-dihydronérolidol (Cane *et al.*, 1990; Cane et Yang, 1994). D'un autre côté, des expériences de compétition de substrats utilisant le FPP et le NPP radiomarqués ont établi qu'il n'y avait pas d'interconversion des substrats diphosphate allylique libres de l'enzyme et que le (3*R*)-NPP n'était jamais relâché du site actif de l'enzyme (Cane et Ha, 1988).

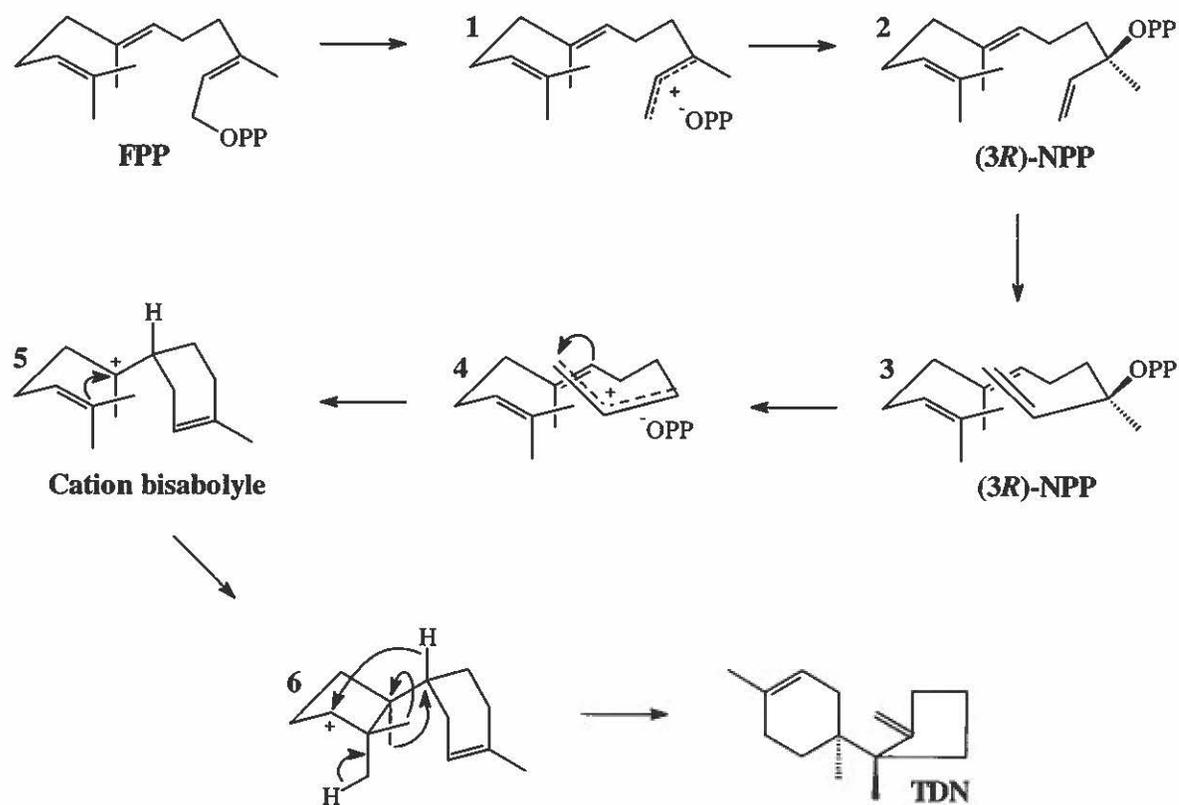


Figure 10: Mécanisme de cyclisation du farnésyl diphosphate au trichodiène.

Ainsi, l'enzyme qui catalyse la cyclisation du FPP au trichodiène est la trichodiène synthase, la première enzyme unique dans la voie de biosynthèse des trichothécènes. Elle a été isolée pour la première fois à partir de *Trichothecium roseum* (Evans et Hanson, 1976), puis purifiée à homogénéité à partir de *F. sporotrichioides* avec une activité spécifique quinze fois supérieure à celle de l'extrait de départ (Hohn et VanMiddlesworth, 1986). Il s'agit d'un homodimère de 45 kilodaltons (kDa) dont le gène *TRI5* codant pour cette enzyme a été isolé chez *F. sporotrichioides* (Hohn et Beremand, 1989), *F. sambucinum* (Hohn et Desjardins, 1992), *F. poae* (Fekete *et al.*, 1995), et *F. graminearum* (Proctor *et al.*, 1995a), puis a été surexprimé avec un rendement de 25-30% des protéines totales chez *Escherichia coli* (Cane *et al.*, 1993). Récemment, le gène *MRTRI5* provenant de *Myrothecium roridum* a été isolé et une homologie de séquence par rapport aux gènes *TRI5* provenant des espèces *Fusarium* a été trouvée (Trapp *et al.*, 1998).

3.3 Le trichodiène: premier intermédiaire spécifique dans la biosynthèse

J.D. Bu'Lock (1965) a suggéré qu'une structure, du nom de trichodiène (TDN), pouvait être un métabolite naturel et ainsi un précurseur potentiel du trichothécine. Or, en 1972, le composé trichodiène a été isolé comme métabolite naturel provenant de *Trichothecium roseum* tel que l'avait imaginé Bu'Lock sept ans auparavant (Nozoe et Machida, 1972). En donnant du [16-³H]trichodiène à une culture de *T. roseum*, leurs résultats ont suggéré qu'il était un précurseur des trichothécènes chez ce microorganisme avec 3.2% d'incorporation dans le trichothécolone (Machida et Nozoe, 1972a), dont la structure est semblable à celle du trichothécine mais avec une fonction alcool en C-4 au lieu d'une fonction isocrotonate. Cependant, la localisation précise du marquage dans ce trichothécène n'a pas été déterminée et ne prouvait pas avec certitude que le trichodiène était un précurseur biosynthétique. De plus, Evans et Hanson (1976) ont aussi rapporté que le [13-¹⁴C]trichodiène était incorporé dans les trichothécènes mais encore une fois la localisation précise du marquage n'a pas été déterminée. Desjardins *et al.* (1986) ont démontré en incubant *Fusarium sporotrichioides* avec ¹⁸O, que les atomes d'oxygènes à la position 1, le 12,13-époxyde et le groupe hydroxyle en C-3, C-4, C-8 et C-15 de la toxine T-2 provenaient tous de l'oxygène moléculaire. Ainsi, avec ce résultat ils ont suggéré que

les oxydations enzymatiques du trichodiène pouvaient être catalysées par une variété de monooxygénases. L'ajout dans le milieu de culture d'un inhibiteur de monooxygénase devrait prévenir la production de la toxine T-2. En effet, VanMiddlesworth *et al.* (1986) ainsi que Desjardins *et al.* (1987) ont traité les souches *F. sambucinum* et *F. sporotrichioides* avec l'ancymidol, un inhibiteur connu des cytochromes P450 monooxygénases. Leurs résultats ont démontré que la production des trichothécènes, dont celle de la toxine T-2, était bloquée et il y avait une accumulation du précurseur biosynthétique trichodiène.

Disposer de souches mutantes dont la production est bloquée ou altérée constitue un outil utile pour l'étude de la biosynthèse des trichothécènes. C'est ce qu'a obtenu Beremand (1987) en irradiant *F. sporotrichioides* aux rayons ultraviolets. Il a isolé des mutants de cette espèce dont la production de la toxine T-2 était bloquée à différentes étapes avec accumulation d'intermédiaires. D'ailleurs, il a réussi avec cette technique à obtenir la souche mutante MB5493 qui a accumulé le trichodiène (Beremand *et al.*, 1988). Avec tous ces résultats, l'accumulation du trichodiène suggérait qu'il était un précurseur biosynthétique des trichothécènes sans toutefois le prouver avec certitude. L'établissement d'une preuve rigoureuse était alors nécessaire. C'est ce qu'a prouvé Zamir *et al.* (1989) en synthétisant le trichodiène et son isomère bazzanène (BZN) marqués avec du deutérium ou du tritium en C-15 afin de les incuber dans un milieu de culture contenant *F. culmorum* (Figure 11). Il est à noter que le bazzanène a été isolé pour la première fois comme métabolite secondaire chez la plante *Bazzania pompeana*, donc qu'il est un produit naturel (Ohta *et al.*, 1977). Ainsi, l'incorporation du [15-²H]trichodiène dans le 3-ADN et SOL tel que prévu a été démontrée par la localisation en position C-15 des deux atomes de deutérium par ²H RMN dans ces deux trichothécènes, contrairement à l'alimentation avec le [15-²H]bazzanène où aucune détection n'a été enregistrée. L'utilisation de [15-³H]trichodiène et de [15-³H]bazzanène a donné des résultats identiques. Une expérience similaire a été effectuée par Savard *et al.* (1989) avec *F. culmorum* en utilisant les mêmes précurseurs mais marqués avec du ¹³C à la position C-13 et leurs résultats ont confirmé l'étude précédente.

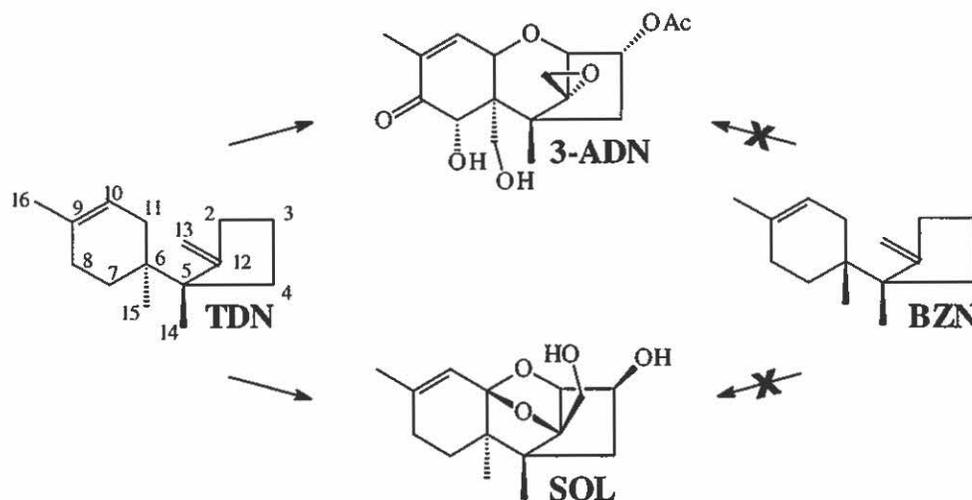


Figure 11: Le trichodiène est le précurseur du 3-acétyldésoxyvalénol et du sambucinol chez *Fusarium culmorum* et non pas le bazzanène.

3.4 Du bicyclique au tricyclique: oxygénations post-trichodiène

La deuxième partie de la biosynthèse des trichothécènes, c'est-à-dire du trichodiène aux différents composés tricycliques trichothécènes, est moins bien connue que la première. Comme mentionné précédemment, le trichodiène semble subir plusieurs oxygénations catalysées par des monooxygénases. Par la suite, une cyclisation mène à un premier intermédiaire tricyclique puis d'autres oxygénations mènent ultimement aux produits finaux tricycliques, tels que le 3-ADN et SOL chez *F. culmorum*. La stéréochimie de ces oxygénations a été démontrée par Zamir *et al.* (1987b) avec des expériences d'alimentation utilisant le (3*RS*)-(5*R*)-[5-²H]mévalonolactone, (3*RS*)-(5*S*)-[5-²H]mévalonolactone, et (3*RS*)-[5-²H]mévalonolactone. Les résultats ont établi que l'hydroxylation en position C-3 et C-7 du 3-ADN remplaçait un atome d'hydrogène 5-*pro-R* du mévalonate et l'hydroxylation en C-11 du 3-ADN remplaçait un atome d'hydrogène 5-*pro-S* du mévalonate. De plus, le repliement du FPP a montré que dans ces trois positions, les nouvelles liaisons carbone-oxygène possédaient la même orientation stéréochimique relative que celles des liaisons carbone-hydrogène remplacées. De ce fait, il y a une rétention de configuration durant les oxygénations post-trichodiène.

Dans notre laboratoire, la technique de *kinetic pulse-labeling* a été grandement utilisée pour la détection d'intermédiaires biosynthétiques des trichothécènes (Zamir et Devor, 1987a). Elle se base sur l'alimentation d'un précurseur primaire (*i.e.*, acétate, mévalonate, glucose, etc...) radiomarké à une culture liquide d'un microorganisme et sur l'analyse de l'apparition séquentielle des métabolites radiomarkés nouvellement biosynthétisés à différents intervalles de temps. Cette méthode permet facilement de détecter des intermédiaires transitoires, en plus de les différencier des métabolites finaux. Ainsi, elle a permis de détecter le premier intermédiaire tricyclique dans la biosynthèse du 3-ADN chez *F. culmorum*, soit l'isotrichodermine (ITD), isolé pour la première fois chez *F. graminearum* (Greenhalgh *et al.*, 1986). L'ITD ainsi obtenu (par l'alimentation de [2-¹⁴C]mévalonate à une culture de *F. culmorum*) a été purifié jusqu'à l'obtention d'une activité spécifique constante puis donné à une culture de *F. culmorum* (Zamir *et al.*, 1990). Cette expérience a démontré qu'il était précurseur du 3-ADN avec 27% d'incorporation, mais non du SOL (Figure 12). Par une analyse du spectre ²H RMN du 3-ADN obtenu lors de l'alimentation du [4β,15-²H]isotrichodermine notre laboratoire a bel et bien établi que l'ITD était un précurseur avec les deux atomes de deutérium qui se retrouvaient aux mêmes positions (Zamir *et al.*, 1991b).

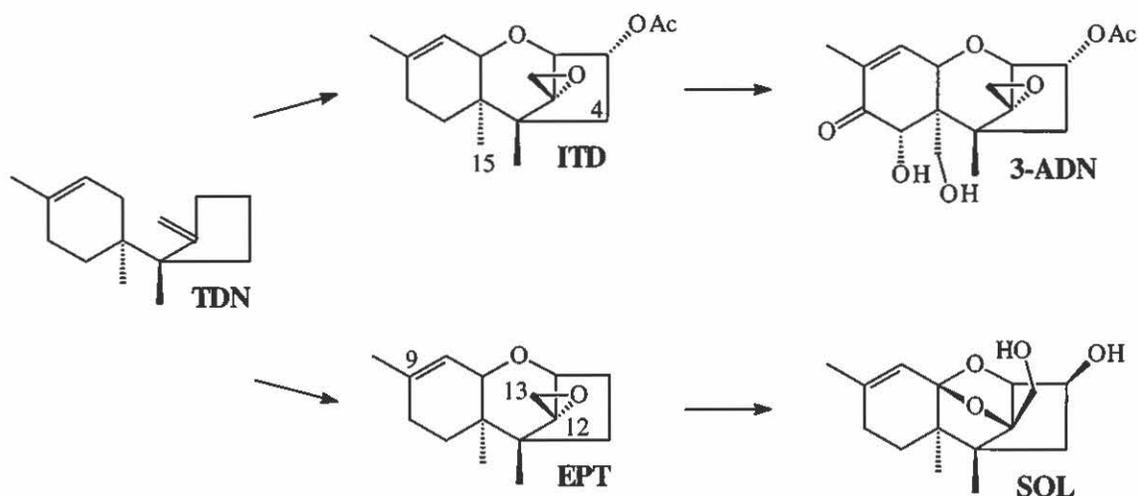


Figure 12: L'isotrichodermine (ITD) et le 12,13-époxytrichothéc-9-ène (EPT) ont été les premiers intermédiaires tricycliques rigoureusement prouvés dans la biosynthèse du 3-ADN et SOL chez *F. culmorum*.

Par ailleurs, le 12,13-époxytrichothéc-9-ène (EPT) isolé pour la première fois chez *Trichothecium roseum* (Machida et Nozoe, 1972b), et chez *F. culmorum* par Baldwin *et al.* (1985) a été identifié comme premier intermédiaire tricyclique du SOL mais non du 3-ADN (Zamir *et al.*, 1990) (Figure 12). *F. culmorum* incorpore le [15-³H]époxytrichothécène à 15% dans le SOL mais aucune radioactivité n'a été détectée dans le 3-ADN et l'ITD. De plus, une analyse du spectre ²H RMN du SOL obtenu par l'alimentation du [4 α ,4 β ,15,15-²H]époxytrichothécène a confirmée que l'EPT était un précurseur avec les atomes de deutérium qui se retrouvaient aux mêmes positions.

La découverte de nombreux intermédiaires oxygénés post-trichodiène a permis de mieux comprendre les étapes entre le trichodiène et les composés ITD et EPT. Hesketh *et al.* (1990, 1991) ont isolé l'isotrichodiol (12,13-époxytrichodiène-2 α ,11 α -diol) chez *F. culmorum* et ont rigoureusement démontré qu'il était le premier intermédiaire biosynthétique post-trichodiène (Figure 13). Ainsi, une expérience d'alimentation en [¹⁴C]trichodiène (obtenu par une alimentation avec [2-¹⁴C]acétate et l'inhibiteur de

monooxygénase xanthotoxine) chez des cultures de *F. culmorum* traitées avec la xanthotoxine a permis d'isoler le [¹⁴C]isotrichodiol où 67% d'incorporation du [¹⁴C]trichodiène a été détectée. Subséquemment, en donnant ce dernier à une culture de *F. culmorum*, ils ont démontré par l'analyse d'un autoradiogramme d'une chromatographie sur couche mince de l'extrait du milieu de culture, qu'il était incorporé, entre autres, dans les trichothécènes ITD et EPT. Ainsi, la conversion du trichodiène en isotrichodiol nécessite trois oxygénations, soit en C-2, C-11, et C-12/13 (époxydation).

Un précurseur possible, le 11 α -hydroxytrichodiène a été isolé d'une souche mutante de *F. sporotrichioides* obtenue par irradiation aux UV (McCormick *et al.*, 1989). Cependant, des expériences d'alimentation de ce composé ont démontré qu'il n'était pas impliqué dans la biosynthèse des trichothécènes, mais plutôt dans celle des apotrichothécènes (McCormick *et al.*, 1989; Zamir *et al.*, 1999b).

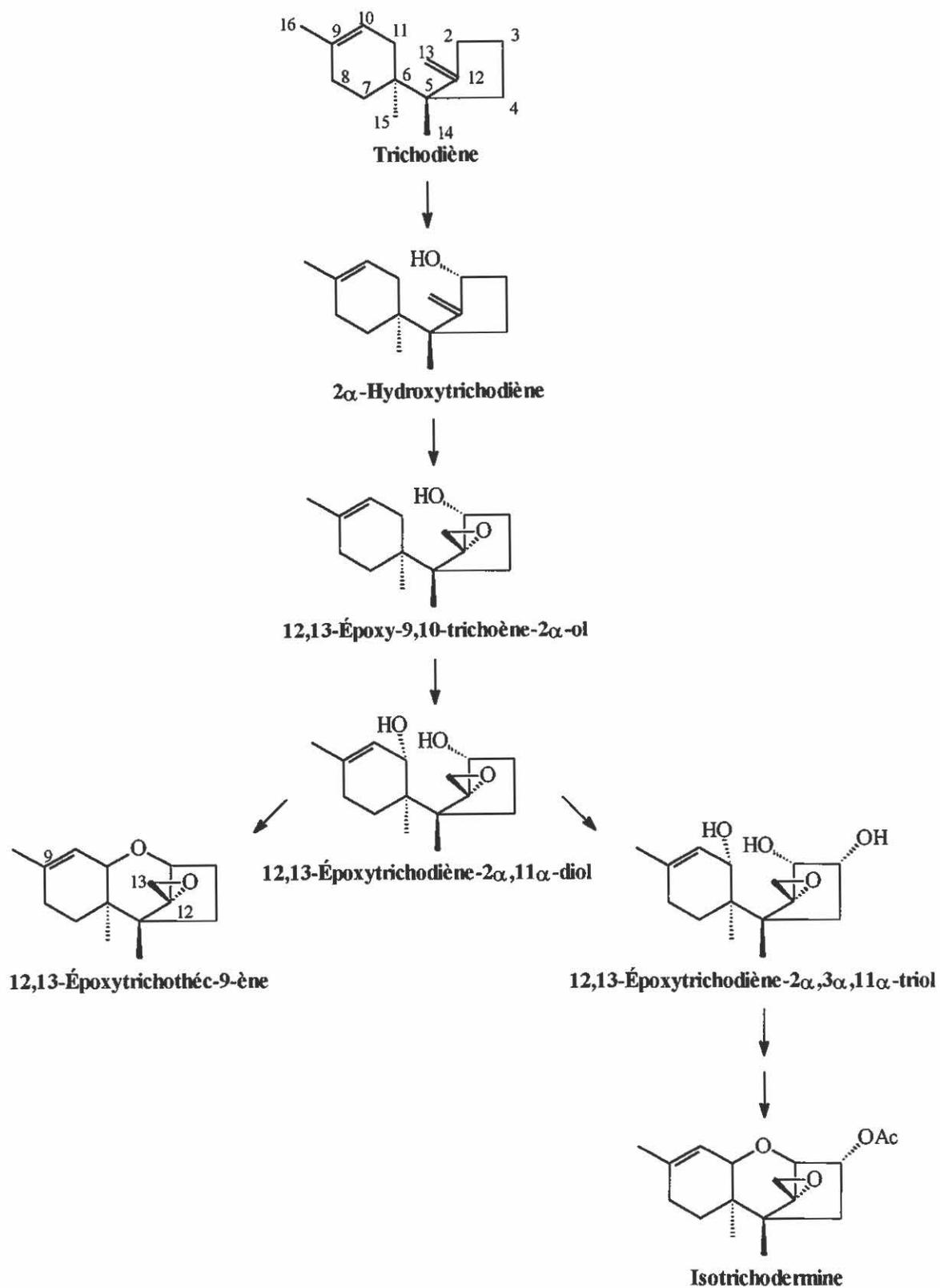


Figure 13: Oxygénations post-trichodiène dans la partie bicyclique de la biosynthèse des trichothécènes.

Corley *et al.* (1987) ont isolé le trichotriol et son composé relatif le trichodiol chez *F. sporotrichioides*. Cependant, leur rôle dans la biosynthèse n'a pas été déterminé (figure 14). Le trichodiol a été isolé pour la première fois chez *Trichothecium roseum* (Nozoe et Machida, 1970) et démontré comme précurseur du trichothécine (Machida et Nozoe, 1972b). Par ailleurs, McCormick *et al.* (1989) ont isolé l'isotrichotriol (12,13-époxytrichodiène-2 α ,3 α ,11 α -triol) (Figure 13) et l'isotrichodermol (isotrichodermine sans le groupement acétyle) d'une souche mutante de *F. sporotrichioides* obtenue par irradiation aux UV, ne produisant pas la toxine T-2. L'année suivante, ils ont démontré en donnant l'isotrichotriol, le trichotriol, et l'isotrichodermol à la souche mutante *F. sporotrichioides* MB5493 (qui accumulait le trichodiène et non la toxine T-2) que ces composés étaient tous convertis en toxine T-2 (McCormick *et al.*, 1990). Ils ont aussi démontré que l'oxygénation en C-3 se produisait avant celle en C-15 et C-4, et avant la deuxième cyclisation. L'isotrichotriol est reconnu pour isomériser en trichotriol, tandis que l'isotrichodiol est reconnu pour isomériser en trichodiol. Il a été démontré que le trichotriol et le trichodiol cyclisaient respectivement en isotrichodermol (Corley *et al.*, 1987) et en époxytrichothécène (Machida et Nozoe, 1972b).

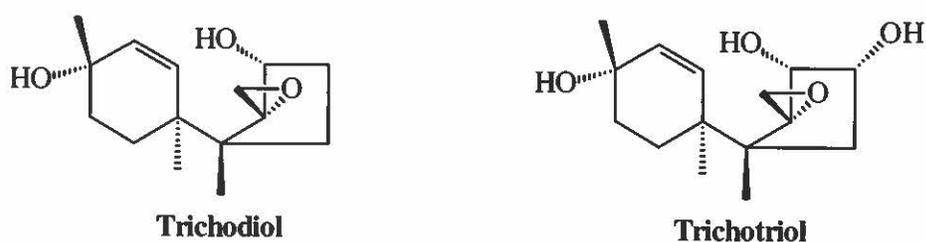


Figure 14: Le trichodiol et trichotriol sont respectivement des produits d'isomérisation allylique de l'isotrichodiol et de l'isotrichotriol.

Un autre composé bicyclique, le 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol (Figure 13), a été isolé et purifié par Zamir *et al.* (1991a) à partir de cultures de *F. culmorum* alimentés avec du [2-¹⁴C]mévalonate puis traitées avec l'inhibiteur de monooxygénase ancyimidol. Ils ont de plus démontré par des expériences d'alimentation son incorporation dans le 3-ADN et SOL avec 5-7% d'incorporation. Gledhill *et al.* (1991) ont réussi avec un système acellulaire de *F. culmorum* à catalyser la 12,13-époxydation d'un composé semi-synthétique non-naturel 9 β ,10 β -époxytrichodiène à 9 β ,10 β ;12,13-diépoxytrichodiène (Figure 15). Cette époxydation enzymatique était dépendante en NADPH et en oxygène moléculaire, puis fortement inhibée par la présence de monoxyde de carbone. Ainsi, elle semble être due à une cytochrome P450 monooxygénase. Avec la preuve que le 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol est un précurseur dans la biosynthèse des trichothécènes et la non époxydation du trichodiène par ce même système acellulaire, les auteurs ont suggéré que la 12,13-époxydation procédait après la 2-hydroxylation (Hesketh *et al.*, 1993).

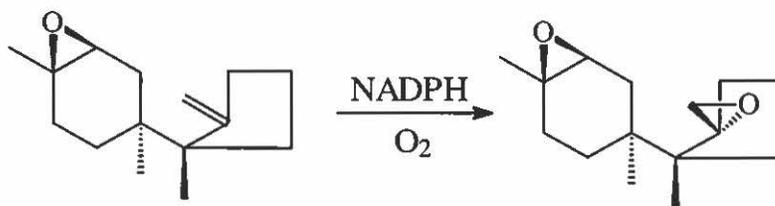


Figure 15: Époxydation du composé semi-synthétique 9 β ,10 β -époxytrichodiène dans un extrait cellulaire de *F. culmorum*.

Ainsi, le 2 α -hydroxytrichodiène (Figure 13) serait le premier intermédiaire oxygéné post-trichodiène. Cependant, rien dans la littérature ne rapporte son isolement. Par conséquent, dans notre laboratoire, le 2 α -hydroxytrichodiène et le 12,13-époxytrichodiène ont été synthétisés avec la présence d'isotope stable en position C-16 (¹³C) et C-15 (²H) respectivement (Zamir *et al.*, 1999a), c'est-à-dire les deux intermédiaires possibles entre le trichodiène et le 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol. Les

résultats ont démontré que le 2 α -hydroxytrichodiène est l'intermédiaire incorporé dans le 3-ADN et le SOL chez *F. culmorum* à raison de 26-29% et de 34-39% respectivement. Il semble ainsi être le premier intermédiaire oxygéné post-trichodiène. Par ailleurs, Hohn *et al.* (1995) ont isolé le gène *TRI4* chez *F. sporotrichioides* codant pour une protéine de 59 kDa identifiée comme une cytochrome P450 monooxygénase. L'inactivation de ce gène a résulté en la perte de production de trichothécènes et l'accumulation de l'intermédiaire non-oxygéné trichodiène. Les auteurs ont suggéré que cette enzyme est responsable de la première oxygénation du trichodiène mais ils n'ont pas été en mesure d'identifier ce premier intermédiaire oxygéné. Récemment, le gène *MRTRI4* a été isolé chez *Myrothecium roridum*, celui-ci est reconnu pour la production de trichothécènes macrocycliques (Trapp *et al.*, 1998). Ainsi, il possède 63% d'homologie de séquence avec celui isolé chez *F. sporotrichioides*, et semble aussi responsable de la première oxygénation du trichodiène.

4.0 Cytochromes P450 monooxygénases dans la biosynthèse des trichothécènes

Dans la biosynthèse du 3-ADN, le trichodiène subit, entre autres, sept oxygénations séquentielles afin de mener à ce produit final. Généralement, les oxygénations de ce type sont catalysées par des monooxygénases appartenant à la superfamille cytochrome P450. Il existe près de 500 gènes codant pour les protéines cytochromes P450 dont la majorité a été complètement séquencée (Nelson *et al.*, 1996). Bien que la plupart de ces gènes ont été identifiés chez les mammifères, le nombre grandissant de séquences provient des plantes, les insectes et les bactéries.

Les cytochromes P450 chez les champignons sont de plus en plus étudiés avec maintenant une cinquantaine de gènes découverts (Van Den Brink *et al.*, 1998). L'identification de la majorité des nouveaux gènes est basée selon l'alignement de séquences avec les familles connues plutôt que sur la base du fonctionnement enzymatique. C'est le cas, entre autres, des gènes *TRI4* (Hohn *et al.*, 1995) et *TRIII* (Alexander *et al.*, 1998) chez *F. sporotrichioides*. Ces résultats démontrent que le mode

de fonctionnement des monooxygénases impliquées dans la biosynthèse des trichothécènes est inconnu. Les seules informations sur ce sujet proviennent des études sur l'époxidation d'un analogue au trichodiène et l'oxygénation de l'isotrichodermine par des systèmes acellulaires, tel que mentionné précédemment. La réaction la plus commune catalysée par les cytochromes P450 est une réaction de monooxygénase où un atome de l'oxygène moléculaire est inséré dans le substrat et l'autre est réduit en eau (Figure 16).



Figure 16: Équation générale de monooxygénation par les cytochromes P450.

Essentiellement, tous les cytochromes P450 nécessitent une source externe d'électrons qui est habituellement NADPH ou NADH. Ainsi, ils sont classés selon le mode de transport des électrons, du nucléotide pyridine réduit au noyau hème, qui comprend deux classes (Peterson *et al.*, 1997). La classe I requiert une réductase dépendante en FAD et une ferredoxine. Cette dernière sert à transporter les électrons un à un de la réductase au P450. Quant à la classe II, elle requiert une réductase dépendante en FAD et FMN afin de transporter les électrons du nucléotide pyridine réduit au cytochrome P450. La classe I est typique des P450 mitochondriales et procaryotes, tandis que la classe II est typique des cytochromes P450 localisés dans le réticulum endoplasmique.

5.0 Objectifs de cette étude

La contamination du blé, de l'orge et du maïs par les trichothécènes cause de nombreux problèmes économiques et des inquiétudes sérieuses dans le domaine de l'agriculture, principalement dans le nord des États-Unis et au Canada. Il existe de nombreuses raisons de craindre la présence de ces mycotoxines dans les récoltes servant à la production d'aliments. Le rendement, la qualité et par conséquent la valeur

commerciale des récoltes pour les producteurs sont diminués, ce qui implique aussi des pertes financières pour l'industrie de la transformation qui se doit d'importer ces céréales. De plus, la toxicité des trichothécènes est reconnue depuis longtemps pour les humains et les animaux de fermes. Ainsi, la contamination fréquente des récoltes combinée à la résistance au processus industriel de transformation, rend les trichothécènes persistant dans la nourriture destinée aux humains et aux animaux.

Une des méthodes possible pour contrôler ou prévenir ce problème est de bloquer la production biologique de ces métabolites toxiques. Cependant, les connaissances sur l'enzymologie de la biosynthèse des trichothécènes ne sont pas très approfondies. La meilleure stratégie à envisager est d'inhiber cette biosynthèse dans les premières étapes, c'est-à-dire au stade bicyclique, étapes qui semblent être communes chez toutes les espèces de champignons produisant les trichothécènes. Il est connu que la présence de la fonction 12,13-époxyde et les différents groupements hydroxyles et acétyles confèrent la toxicité aux trichothécènes, en particulier au stade tricyclique. Ainsi, en inhibant une réaction dans les débuts de la biosynthèse il devrait y avoir accumulation d'un composé non-toxique.

Il y a quelques années, plusieurs inhibiteurs ont été synthétisés dans notre laboratoire (Zamir *et al.*, 1992b, 1992c). Un de ceux-ci, le 15-fluoroépoxytrichothécène, a inhibé avec succès la production de 3-ADN avec un pourcentage d'inhibition de 96% à 0,50 mM. Cependant, une autre approche pour inhiber cette biosynthèse est la première oxygénation du trichodiène. Par conséquent, le but de ce travail est d'isoler le produit de cette réaction enzymatique comme métabolite naturel chez *Fusarium culmorum* pour ensuite isoler la monooxygénase qui catalyse cette réaction.

Approche **E**xpérimentale

1.0 Liste des produits chimiques

Acétate de sodium (J. T. Baker)

Acétate d'éthyle (EM Science)

2 α -Acétoxytrichodiène (Synthétisé dans notre laboratoire)

Acide éthylènediamine tétraacétique: EDTA (Sigma)

Acide hydrochloridrique: HCl (Fisher)

Acrylamide (Sigma)

Adénosine 2'-monophosphate: 2'AMP (Sigma)

Adénosine 2',5'-diphosphate (2',5'-ADP) Sépharose 4B (Pharmacia)

Albumine bovin (Sigma)

Anhydride acétique (Aldrich)

[1'-¹⁴C]Anhydride acétique (Amersham)

Azote (Praxair)

Bacto-peptone (Difco)

Bleu de bromophénol (BDH)

Brij 35 (J. T. Baker)

Chlorure d'ammonium: NH₄Cl (Anachemia)

Chlorure de potassium: KCl (J. T. Baker)

Chlorure de sodium: NaCl (Anachemia)

Chloroforme deutéré: CDCl₃ (Cambridge Isotope Laboratories)

Dextrose (Anachemia)

Dithiothréitol: DTT (Sigma)

Extrait de levure (Difco)

Extrait de malt (Difco)

Flavine adénine dinucléotide: FAD (Sigma)

Flavine mononucléotide: FMN (Sigma)

Fluorure de phénylméthylsulfonyl: PMSF (Sigma)

Glycérol (Anachemia)

Glycine (Fisher)

Hexane (EM Science)
2 α -Hydroxytrichodiène (Synthétisé dans notre laboratoire)
Isopropanol (EM Science)
Méthanol (Anachemia)
 β -Mercaptoéthanol (Pharmacia)
N,N'-Méthylène-bis acrylamide (Sigma)
Nicotinamide adénine dinucléotide: NADH (Sigma)
Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate: NADPH (Sigma)
Patate dextrose agar (Difco)
Pentane (Anachemia)
Peroxyde d'hydrogène 30%: H₂O₂ (Aldrich)
Persulfate d'ammonium (Sigma)
Phosphate d'ammonium dibasique: (NH₄)₂HPO₄ (Fisher)
Phosphate de potassium dibasique: K₂HPO₄ (Fisher)
Phosphate de potassium monobasique: KH₂PO₄ (Fisher)
Pyridine (Anachemia)
Réactif de phénol de Folin & Ciocalteu's (Sigma)
Sucrose (Anachemia)
Sulfate de magnésium: MgSO₄ · 7 H₂O (Fisher)
Sulfate de magnésium anhydre: MgSO₄ anhydre (Fisher)
Sulfate ferrique: Fe₂(SO₄)₃ · n H₂O (Fisher)
TEMED (Sigma)
3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (Sigma)
[11 α , 11 β -²H₂]15-³H-Trichodiène (Synthétisé dans notre laboratoire)
Trichodiène (Synthétisé dans notre laboratoire)
Tris (Fisher)
Ultima Gold XR (Canberra Packard)

2.0 Milieux de cultures

Les milieux de cultures ont été préparés selon la méthode déjà publiée (Zamir et Devor, 1987a).

2.1 Milieu PDA

Une quantité du produit déshydraté patate dextrose agar, soit 39 g, est solubilisée dans 1 litre d'eau distillée en chauffant. Le milieu est stérilisé à 121°C pendant 20 minutes à l'autoclave. Il est ensuite refroidi jusqu'à 45-50°C pour être coulé dans un tube disposé de façon inclinée.

2.2 Milieu d'ensemencement

Le milieu d'ensemencement est composé de 2,0 g d'extrait de malt, de 2,0 g d'extrait de levure, de 2,0 g de Bacto-peptone, de 20,0 g de dextrose, de 3,0 g de NH_4Cl , de 2,0 g de KH_2PO_4 , de 2,0 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, et de 0,2 g de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n \text{H}_2\text{O}$ par litre d'eau distillée. Dans chaque flacon d'Erlenmeyer de 250 ml on ajoute 50 ml de ce milieu pour ensuite les stériliser à 121°C pendant 20 minutes à l'autoclave.

2.3 Milieu de production

Le milieu de production est composé de 10,0 g de glycérol, de 40,0 g de sucre, de 1,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, de 3,0 g de KH_2PO_4 , de 5,0 g de NaCl , et de 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ par litre d'eau distillée. Dans chaque flacon d'Erlenmeyer de 125 ml on ajoute 25 ml de ce milieu avant de les faire stériliser à 121°C pendant 20 minutes à l'autoclave. C'est dans ce milieu que *F. culmorum* produit les trichothécènes.

3.0 Culture de *Fusarium culmorum*

La culture de cette moisissure a été réalisée selon le protocole déjà publié (Zamir et Devor, 1987a). La souche utilisée *F. culmorum* HLX 1503 a été généreusement donnée par le Dr J. David Miller du Centre de Recherches de l'Est sur les Céréales et les Oléagineux, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Ottawa, Ontario. La souche était conservée à 4°C dans un tube incliné contenant 2% de PDA. Une portion de celle-ci est homogénéisée avec un homogénéisateur Polytron (Brinkman Instruments) pendant 10 sec dans un bécher de 100 ml contenant 50 ml d'eau distillée préalablement stérilisé à 121°C pendant 20 minutes à l'autoclave. Dans chaque flacon d'Erlenmeyer de 250 ml contenant le milieu d'ensemencement est ajouté 2,5 ml de cet homogénat. L'incubation se faisait à 25°C durant 3 jours avec une agitation de 220 rpm sur un agitateur New Brunswick G-25 couplé à un bain réfrigérant modèle RF-10 (New Brunswick Scientific Co. Inc).

Par la suite, deux flacons d'Erlenmeyers contenant le milieu d'ensemencement ont été sélectionnés. Il fallait que *F. culmorum* possède une apparence de petites boules blanches dans la solution qui se devait d'être claire. Le contenu de ces deux flacons était transvidé dans un bécher de 250 ml (stérilisé à 121°C pendant 20 minutes à l'autoclave), puis homogénéisé avec l'homogénéisateur Polytron pendant 30 sec. Dans chaque flacon d'Erlenmeyer de 125 ml contenant le milieu de production était ajouté 1,5 ml de cet homogénat. L'incubation se faisait à 25°C durant 3 jours avec une agitation de 220 rpm sur l'agitateur New Brunswick G-25 couplé au bain réfrigérant modèle RF-10.

4.0 Isolement du 2 α -hydroxytrichodiène

Cette expérience a été réalisée trois fois, c'est-à-dire de la production des trichothécènes par *F. culmorum* jusqu'à la purification du 2 α -hydroxytrichodiène.

4.1 Extraction du milieu de production de *F. culmorum*

Le milieu de production qui consistait en 200 flacons d'Erlenmeyers de 125 ml contenant 25 ml de ce milieu avec *F. culmorum*, était filtré sous-vide sur une membrane Miracloth (Calbiochem Corporation). Chaque litre du milieu de production sans le mycélium, pour un total de 5 litres, était extrait avec 3 x 500 ml d'acétate d'éthyle dans une ampoule à extraction de 2 L. Après avoir combiné ces trois extraits, ce 1,5 L était lavé 3 fois avec 500 ml d'une solution saturée en NaCl (360g NaCl / litre H₂O) dans la même ampoule pour finalement être séché avec du MgSO₄ anhydre. Après filtration sous-vide sur un papier filtre (Whatman #1), l'extrait était évaporé sous pression réduite avec un évaporateur rotatif Büchi RE 121 Rotavapor couplé à un bain d'eau à température contrôlée Büchi 441 (Brinkmann) et donnait une huile jaune. La masse totale des extraits du milieu de production était de 1,4 g. Cet extrait était dissout dans 2 ml de méthanol afin d'être fractionné au chromatographe liquide à haute pression (HPLC).

4.2 Purification du pic HPLC correspondant au temps de rétention du 2 α -hydroxytrichodiène synthétisé

L'extrait de 1,4 g dans 2 ml de méthanol était fractionné en six injections dans une colonne préparative Whatman partisil 10 ODS-2 (22 x 500 mm) avec un système HPLC préparatif de marque Waters Delta 3000 couplé à un détecteur de longueur d'onde variable Waters 486 Tunable Absorbance Detector ajusté à 204 nm. Le programme HPLC utilisé, nommé programme A, consistait en un gradient linéaire de 50 min avec une concentration initiale de 40% méthanol, 60% eau et une concentration finale de 100% méthanol qui était maintenue durant 20 min dont le débit était de 18 ml/min. Les fractions

correspondant aux temps de rétention 49 à 60 min étaient collectées puis combinées afin d'être évaporées sous pression réduite à un volume de 10 ml. Ce dernier était extrait 3 fois avec 5 ml de pentane. Après l'évaporation du pentane sous un faible jet d'azote, 400 µl de méthanol était ajouté afin de fractionner en une injection dans deux colonnes semi-préparatives Whatman partisol 10 ODS-2 (9,4 x 250 mm) montées en série avec le système HPLC Waters Delta 3000 mentionné précédemment. L'élution se faisait avec le programme A, mais avec un débit de 3 ml/min. Le pic à 55,8 min correspondait au temps de rétention du 2 α -hydroxytrichodiène synthétisé (Zamir *et al.*, 1999b), il était récolté afin d'être extrait 3 fois avec 2 ml de pentane. Par la suite, le solvant était évaporé sous un faible jet d'azote.

4.3 Acétylation du pic HPLC correspondant au temps de rétention du 2 α -hydroxytrichodiène synthétisé

Dans ce composé, était ajouté 120 µl de pyridine et 25 µl, (12,5 µCi) de [1'-¹⁴C]anhydride acétique (100 mCi/mmol). Le mélange était incubé sans agitation à la température de la pièce pendant 24 heures. Par la suite, 145 µl d'anhydride acétique non-marqué radioactivement était ajouté au mélange et incubé pour une autre période de 24 heures sans agitation à la température de la pièce. Après l'évaporation de la pyridine et de l'anhydride acétique sous un faible jet d'azote, 100 µl de méthanol était ajouté afin de fractionner en une injection dans deux colonnes analytiques Whatman partisol 10 ODS-2 (4,6 x 250 mm) montées en série avec un système HPLC Perkin-Elmer séries 3B couplé à un détecteur de longueur d'onde variable Perkin-Elmer LC-75 ajusté à 204 nm. L'élution consistait en une condition isocratique de 80% méthanol et 20% eau à 1 ml/min. Le pic à 56,0 min correspondant au temps de rétention du 2 α -acétoxytrichodiène synthétisé était collecté en trois portions environ égales. La deuxième et troisième portion du pic étaient combinées afin d'être extrait sur une colonne Extube ChemElut CE 1003 (Varian) avec 4 fois 10 ml de pentane. Ensuite, le solvant était évaporé sous un faible jet d'azote et 100 µl de méthanol était ajouté.

4.4 Purification du pic HPLC correspondant au temps de rétention 2 α -acétoxytrichodiène synthétisé

Ce 100 μ l était injecté une première fois au HPLC analytique, tel que mentionné dans le paragraphe précédent, avec une élution qui consistait en une condition isocratique de 85% méthanol et 15% eau à 1 ml/min. Le pic à 32,0 min correspondant au temps de rétention du 2 α -acétoxytrichodiène synthétisé (Zamir *et al.*, 1999b), il était collecté et la radioactivité était comptée dans un compteur à scintillation Tracor Analytic Delta 300 (Tracor Analytic). Pour ce faire, à 10 μ l de l'échantillon collecté était ajouté 2 ml de liquide à scintillation Ultima Gold XR (Canberra Packard) et compté pendant 10 min. Ce comptage était effectué en triplicata. Ensuite, ce pic collecté était extrait sur une colonne Extube ChemElut CE 1003 avec 4 x 5 ml de pentane. Le solvant était évaporé sous un faible jet d'azote et 100 μ l de méthanol était ajouté afin d'injecter pour une deuxième fois sur le HPLC analytique, mais avec le programme A dont le débit était de 1 ml/min. Le pic à 61,0 min (correspondant au temps de rétention du 2 α -acétoxytrichodiène synthétisé) était collecté et la radioactivité était comptée.

Après évaporation du solvant, 100 μ l de méthanol était ajouté à l'échantillon afin d'être injecté une troisième fois au HPLC analytique mais avec une élution qui consistait en une condition isocratique de 80% méthanol, 20% eau à 1 ml/min. Le pic à 56,0 min (correspondant au temps de rétention du 2 α -acétoxytrichodiène synthétisé) était collecté et la radioactivité comptée. Ce pic était ensuite extrait sur une colonne Extube ChemElut CE 1003 avec 4 x 5 ml de pentane. Le solvant était évaporé sous un faible jet d'azote et 20 μ l de méthanol était ajouté afin d'être déposé sur une plaque HPTLC (chromatographie sur couche mince haute performance) LHP-KF (Whatman) 10 x 10 cm. Cette plaque était éluee avec le mélange de solvant acétate d'éthyle-hexane (4:1), et analysée par l'appareil Bioscan Imaging scanner System 200 couplé à un Auto Changer 1000 et un ordinateur Apple IIe (Bioscan Inc.).

5.0 Isolement du 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol

5.1 Extraction du milieu de production de *F. culmorum*

Le milieu de production qui consistait en 200 flacons d'Erlenmeyers de 125 ml contenant 25 ml de ce milieu avec *F. culmorum*, était filtré sous-vide sur une membrane Miracloth. Chaque litre du milieu de production sans le mycélium, pour un total de 5 litres, était extrait avec 3 x 500 ml d'acétate d'éthyle dans une ampoule à extraction de 2 L. Après avoir combiné ces trois extraits, ce 1,5 L était lavé 3 fois avec 500 ml d'une solution saturée en NaCl (360g NaCl / litre H₂O) dans la même ampoule pour finalement être séché avec du MgSO₄ anhydre. Après filtration sous-vide sur un papier filtre (Whatman #1), l'extrait était évaporé sous pression réduite avec l'évaporateur rotatif et donnait une huile jaune. La masse totale des extraits du milieu de production était de 1,4 g. Cet extrait était dissous dans 2 ml de méthanol afin d'être fractionné au HPLC.

5.2 Purification du 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol

L'extrait de 1,4 g dans 2 ml de méthanol était fractionné en six injections dans une colonne préparative Whatman partisol 10 ODS-2 (22 x 500 mm) avec le système HPLC préparatif. L'élution se faisait avec le programme A avec un débit de 18 ml/min. Les fractions correspondant aux temps de rétention 49 à 60 min étaient collectées puis combinées afin d'être évaporées sous pression réduite à un volume de 10 ml. Ce dernier était extrait 3 fois avec 5 ml de pentane. Après l'évaporation du pentane sous un faible jet d'azote, 400 µl de méthanol était ajouté afin de fractionner cet extrait en une injection dans deux colonnes semi-préparatives Whatman partisol 10 ODS-2 (9,4 x 250 mm) montées en série avec le système HPLC Waters Delta 3000 qui a été mentionné précédemment. Le programme A était utilisé pour l'élution mais avec un débit de 3 ml/min. Le pic à 52,5 min était récolté afin d'être extrait 3 fois avec 2 ml de pentane. Par la suite, le solvant était évaporé sous un faible jet d'azote.

5.3 Caractérisation du 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol

Après l'évaporation du solvant, l'échantillon était dissous dans 1 ml de CDCl_3 afin d'être comparé par RMN par le Dr Françoise Sauriol (Département de chimie, Université McGill) avec le RMN du 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol isolé auparavant (Zamir et al., 1991a).

6.0 Purification du substrat $[11\alpha, 11\beta\text{-}^2\text{H}_2]15\text{-}^3\text{H}$ -trichodiène

Le substrat a été synthétisé par Marie-Claude Rousseau, une étudiante stagiaire de notre laboratoire, d'après la méthode récemment soumise pour publication (Zamir *et al.*, 1999b). Le produit final était dissous dans 1 ml de méthanol afin d'être purifié avec la colonne préparative Whatman partisol 10 ODS-2 (22 x 500 mm) du HPLC préparatif. L'élution consistait à une condition isocratique de 85% méthanol, 15% eau dont le débit était de 18 ml/min. Le pic à 110,0 min était collecté et donnait un volume de 225 ml avec 191 ml de méthanol et 34 ml d'eau. Ainsi, 157 ml d'eau distillée était ajouté (pour obtenir méthanol-eau dans un rapport 1:1) et une extraction dans une ampoule de 500 ml était faite avec 150 ml de pentane 3 fois. Les fractions combinées étaient séchées avec du MgSO_4 anhydre puis filtrées sous vide sur papier Whatman #1. Le solvant était premièrement évaporé à l'aide de l'évaporateur rotatif jusqu'à un volume de 5 ml (20 μl était prélevé pour vérifier la pureté), pour ensuite l'être sous un faible jet d'azote. La masse obtenue était de 41 mg. Afin de s'assurer de la pureté du substrat radioactif, 20 μl était déposé sur une plaque HPTLC LHP-KF 10 x 10 cm. Cette plaque était éluée avec le mélange de solvant acétate d'éthyle-hexane (4:1), et analysée par l'appareil Bioscan Imaging scanner System 200 couplé à un Auto Changer 1000 et un ordinateur Apple IIe. L'activité spécifique de ce substrat était de 0,5 mCi/mme. Finalement, une analyse par RMN était effectuée par l'agent de recherche Anastasia Nikolakakis de notre laboratoire pour vérifier si la structure du substrat était bel et bien correcte.

7.0 Démonstration de l'oxygénation du [11 α , 11 β -²H₂]15-³H-trichodiène par un extrait cellulaire de *F. culmorum*

7.1 Préparation de l'extrait cellulaire

Le milieu de production qui consistait en 130 flacons d'Erlenmeyers de 125 ml contenant 25 ml de ce milieu avec *F. culmorum*, était filtré sous-vide en deux portions sur une membrane Miracloth différente afin de récolter le mycélium. Ce dernier était lavé avec 500 ml d'eau distillée à 4°C pour ensuite être déposé dans un bécher refroidi dans un bain de glace. Le mycélium possédait une masse de 150 g et il était séparé en deux portions. Les étapes suivantes étaient effectuées dans une chambre froide à 4°C. Chacune des deux portions étaient déposées dans un contenant rempli à moitié de billes de verre possédant un diamètre de 0,5 mm (Biospec Products) et ce contenant était ensuite complété avec le tampon d'homogénéisation 50 mM de phosphate de potassium, 100 mM de KCl, 30% de glycérol, pH 7,5. À 600 ml de ce tampon était ajouté 6 ml de DTT à 100 mM, 0,6 ml de PMSF à 100 mM, et 20 mg de EDTA le jour même de cette préparation. Le mycélium était homogénéisé avec l'appareil Bead-Beater (Biospec Products) 3 x 3 sec avec une minute de repos entre chaque coup. Finalement, cet extrait cellulaire était filtré sous vide sur une membrane Miracloth afin d'être utilisé immédiatement ou entreposé à -80°C en portions de 600 μ l.

7.2 Essai de l'activité enzymatique

Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml était ajouté le [11 α , 11 β -²H₂]15-³H-trichodiène en solution dans du pentane pour obtenir environ 800 000 dpm de ce substrat. Le pentane était évaporé sous un faible jet d'azote avant l'ajout des autres composants. Ces derniers étaient ajoutés dans cet ordre, soit 20 μ l de Brij 35 à 0,5%, 370 μ l de DTT à 2,7 mM dans le tampon d'homogénéisation, 10 μ l de ce tampon seul, 500 μ l de l'extrait cellulaire, et 100 μ l de NADPH à 10 mM dans le tampon d'homogénéisation. Ainsi, la concentration finale de ces composants étaient de 0,01% pour le Brij 35, 1 mM pour le NADPH, 1mM

de DTT, et 1,15 mg de protéines dans le volume total de 1 ml. La réaction était initiée par l'ajout du NADPH. Le tube était ensuite incubé pendant 35 min à 25°C avec une agitation de 220 rpm sur l'agitateur New Brunswick G-25 couplé au bain réfrigérant RF-10. Ce mélange réactionnel était immédiatement extrait sur une colonne Extube ChemElut CE 1003 avec 3 x 10 ml d'acétate d'éthyle et évaporé avec beaucoup de précaution, dans un premier temps, sous pression réduite avec l'évaporateur rotatif à la température de la pièce jusqu'à environ 200 µl, et dans un deuxième temps, l'évaporation se faisait sous un faible jet d'azote. Un contrôle était utilisé pour vérifier l'activité de ce système. Il consistait à bouillir l'extrait cellulaire durant 20 min dans un bain d'eau. L'essai de l'activité enzymatique était fait en triplicata, tout comme le contrôle.

7.3 Analyse de la réaction

L'activité enzymatique était mesurée par la quantité de 2 α -hydroxy-[11 α , 11 β -²H]15-³H-trichodiène formé après une incubation de 35 min de l'extrait cellulaire en présence du [11 α , 11 β -²H₂]15-³H-trichodiène. Cette activité était exprimée en dpm par minute par mg de protéine dans l'essai. Après l'incubation, l'extrait du mélange réactionnel était mélangé à 25 µg de 2 α -hydroxytrichodiène synthétisé dans du pentane comme standard interne et le volume était complété à 100 µl de méthanol afin d'être analysé au HPLC. Ce système consistait en deux colonnes analytiques Whatman partisil 10 ODS-2 (4,6 x 250 mm) montées en série avec un HPLC Perkin-Elmer Binary LC Pump 250 couplé à un détecteur de longueur d'onde variable Waters 990 Photodiode Array Detector ajusté à 204 nm, et un ordinateur NEC APC IV PowerMate 2 pour l'analyse. L'élution se faisait avec le programme A à un débit de 1 ml/min, et les fractions étaient collectées à toutes les 4 min de 0 à 40 min, et à toutes les 2 min de 40 à 70 min. Le temps de rétention du [11 α , 11 β -²H₂]15-³H-trichodiène était de 61 min, et de 50 min pour le 2 α -hydroxytrichodiène synthétisé. Aux fractions collectées de 4 ml était ajouté 8 ml de liquide à scintillation, et aux fractions de 2 ml était ajouté 4 ml de liquide à scintillation afin de compter la radioactivité pendant 10 min.

8.0 Localisation intracellulaire de l'activité enzymatique

8.1 Préparation des fractions subcellulaires

Durant la même journée, l'extrait cellulaire était préparé de la même façon qu'au point 7.1 pour être ensuite centrifugé avec un rotor SS-34 dans une centrifugeuse Dupont-Sorvall 5C à 13 000 x g durant 20 min à 2-5°C, afin de récupérer le surnageant dépourvu des débris membranaires et mitochondries contenus dans le culot (Ozols, 1990). Ce surnageant était ensuite centrifugé avec un rotor Ti 60 dans une ultracentrifugeuse Beckman Instruments L5-75 à 120 000 x g durant 50 min à 0-5°C, afin de récupérer le surnageant utilisé comme fraction soluble et le culot utilisé comme fraction microsomal. Le culot était resuspendu dans 60 ml du tampon d'homogénéisation (voir 7.1). Ce dernier tout comme le surnageant étaient utilisés immédiatement ou entreposés à -80°C en portion de 600 µl.

8.2 Essai de l'activité enzymatique

La procédure était la même que celle mentionnée au point 7.2 pour chacune des fractions extrait cellulaire, soluble et microsomal, avec une concentration finale de protéines de 1,71 mg/ml.

8.3 Analyse de la réaction

L'analyse se faisait de la même manière que celle mentionnée au point 7.3.

9.0 Effets des cofacteurs sur l'activité enzymatique dans les microsomes

9.1 Effets du NADH et NADPH

La méthodologie était la même que celle expliquée au point 7.2. Par contre, la concentration finale dans le mélange réactionnel était de 0,01% pour le Brij 35, 1 mM pour le NADPH et/ou le NADH, 1mM de DTT, et 2,0 mg de protéines dans un volume total de 1 ml. La réaction était initiée par l'ajout du (des) co-facteur(s). Deux contrôles étaient utilisés pour vérifier l'effets du (des) cofacteur(s) sur l'activité, ils consistaient d'une part à bouillir les microsomes durant 20 min dans un bain d'eau, et d'autre part à omettre l'ajout de ces cofacteurs. L'essai de l'activité enzymatique était fait en triplicata, tout comme les contrôles.

9.2 Effets du FAD et FMN

La méthodologie était la même que celle expliquée au point 7.2. Cependant, la concentration finale dans le mélange réactionnel était de 0,01% pour le Brij 35, 10 μ M pour le FAD et/ou le FMN, 1 mM pour le NADPH, 1mM de DTT, et 2,0 mg de protéines dans un volume total de 1 ml. La réaction était initiée par l'ajout du NADPH. Deux contrôles étaient utilisés pour vérifier l'effet du (des) cofacteur(s) sur l'activité, ils consistaient d'une part à bouillir les microsomes durant 20 min dans un bain d'eau, et d'autre part à omettre l'ajout du FAD et FMN. L'essai de l'activité enzymatique était fait en triplicata, tout comme les contrôles.

9.3 Analyse des essais enzymatiques

L'analyse se faisait de la même manière que celle mentionnée au point 7.3.

10.0 Solubilisation des microsomes avec le détergent Brij 35

10.1 Préparation des microsomes solubilisés

Toutes les manipulations suivantes étaient effectuées dans une chambre froide maintenue à 4-6°C. Ainsi, à 1 ml de microsome était ajouté goutte à goutte 200 µl d'une solution 1% Brij 35 tout en vortexant assez vigoureusement. Lorsque l'ajout du détergent était terminé, la solution était vortexée pendant 2 min. Ensuite, la solution était passée sur un filtre Acrodisc PF 0,8/0,2 µm (Gelman Sciences). La concentration finale de Brij 35 était donc de 0,17%, et la concentration finale en protéines était de 3,24 mg/ml. Les microsomes solubilisés étaient utilisés immédiatement après leur préparation.

10.2 Essai de l'activité enzymatique

La méthodologie était la même que celle expliquée au point 7.2. Cependant, la concentration finale dans le mélange réactionnel était de 0,1% pour le Brij 35, 10 µM pour le FAD et le FMN, 1 mM pour le NADPH, 1mM de DTT, et 1,62 mg de protéines dans un volume total de 1 ml. La réaction était initiée par l'ajout du NADPH. Un contrôle était utilisé pour vérifier l'effet de la solubilisation des microsomes sur l'activité, il consistait à utiliser les microsomes non solubilisés. L'essai de l'activité enzymatique était fait en triplicata, tout comme le contrôle.

10.3 Analyse des essais enzymatiques

L'analyse se faisait de la même manière que celle mentionnée au point 7.3.

11.0 Détection d'hémoprotéines dans les microsomes solubilisés

11.1 Électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE)

Elle était effectuée selon une modification de la méthode conventionnelle établie par Ornstein (1964) et Davis (1964) pour la séparation de protéines natives. La séparation des protéines dans les microsomes solubilisés était réalisée avec le système d'électrophorèse vertical LKB 2001 avec un générateur de courant EC 500 (EC Apparatus Corporation). Le gel séparateur contenait 8% d'acrylamide, tandis que le gel d'empilement contenait 4% d'acrylamide. Pour un gel de 10 x 10 cm et une épaisseur de 1,5 mm, le gel séparateur était composé de 30 ml d'une solution de 8% acrylamide (8,0 g d'acrylamide et 21,4 mg de N,N'-méthylène-bis acrylamide, 25 ml d'un tampon Tris-HCl 1,5 M à pH 8,8, et 75 ml d'eau distillée), 15 µl TEMED, et 150 µl d'une solution de 10 % de persulfate d'ammonium, tandis que le gel d'empilement était composé de 10 ml d'une solution de 4% acrylamide (4,0 g d'acrylamide et 10,7 mg de N,N'-méthylène-bis acrylamide, 25 ml d'un tampon Tris-HCl 0,5 M à pH 6,8, et 75 ml d'eau distillée), 10 µl TEMED, et 50 µl d'une solution de 10 % de persulfate d'ammonium.

Une quantité connue de microsomes solubilisés était mélangée dans un rapport 4:1 avec le tampon de chargement (20% glycérol, 0,05% bleu de bromophénol et 62,5 mM de Tris-HCl à pH 6,8) et déposé dans un puits du gel. À l'aide du tampon d'électrophorèse (192 mM de glycine et 25 mM du tampon Tris-HCl pH 8.3), la migration était réalisée pendant 3 heures à un voltage constant de 200 volts.

11.2 Coloration du gel à la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB)

Cette coloration était effectuée selon une modification de la méthode conventionnelle établie par Thomas *et al.* (1976) pour la détection d'hémoprotéines dans un gel de polyacrylamide en présence de sulfate de sodium dodécyle. L'utilisation d'un gel natif pour la détection d'hémoprotéines dans les microsomes solubilisés était justifié par la présence possible de cytochromes P450 monooxygénases dont nous ne désirions pas dénaturer.

Le gel natif était ainsi déposé dans 800 ml d'une solution composée de 240 ml de 6,3 mM de TMB (363,3 mg de TMB dans 240 ml de méthanol) et 560 ml de 0,25 d'acétate de sodium à pH 5,0 (34,0 g d'acétate de sodium dans 1 litre d'eau distillée). L'incubation se faisait à 25°C à la noirceur durant 2 heures avec une agitation de 45 rpm sur l'agitateur New Brunswick G-25 couplé au bain réfrigérant modèle RF-10. Après cette incubation, 2,72 ml de H₂O₂ 30% était ajouté et une autre incubation de 30 min se faisait dans les mêmes conditions. Par la suite, le gel était placé dans 600 ml d'une solution d'arrêt composée d'isopropanol et de 0,25 M d'acétate de sodium à pH 5,0 dans un rapport 3:7. Cette dernière était remplacée deux fois par une solution fraîche afin d'enlever tout précipité de TMB.

12.0 Stabilité thermique de l'activité enzymatique

Les microsomes fraîchement solubilisée (voir 10.1) étaient entreposés dans la chambre froide maintenue à une température de 4-6°C afin de vérifier la stabilité de l'activité de monooxygénation du [11 α , 11 β -²H₂]15-³H-trichodiène à ces températures en fonction du temps. Ainsi, le temps zéro correspondait à la fin de la solubilisation des microsomes avec le détergent. Aux temps 4,37 hre, 6,25 hre, 9,5 hre et 23,75 hre l'activité enzymatique était testée selon la même procédure énoncée au point 7.2. Cependant, la concentration finale dans le mélange réactionnel était de 0,1% pour le Brij 35, 10 μ M pour le FAD et le FMN, 1 mM pour le NADPH, et 1mM de DTT dans un volume total de

1 ml. La réaction était initiée par l'ajout du NADPH. Un contrôle était utilisé pour vérifier l'activité de ce système, il consistait à bouillir l'échantillon testé durant 20 min dans un bain d'eau. L'essai de l'activité enzymatique était fait en triplicata, tout comme le contrôle. L'analyse des réactions se faisait de la même manière que celle mentionnée au point 7.3.

13.0 Chromatographie d'affinité des microsomes solubilisés

Toutes les manipulations suivantes étaient effectuées dans une chambre froide maintenue à une température de 4-6°C. Un système de chromatographie liquide rapide à protéine (FPLC) de Pharmacia qui comprenait deux pompes P-500, une pompe péristaltique P-1 pour l'injection, et un contrôleur LCC-500 Plus couplé à un collecteur de fraction 2111 Multirac (LKB Bromma) et un détecteur de longueur d'onde fixe UA-6 UV/VIS Detector (Isco) ajusté à 280 nm. Une colonne de 2 cm de diamètre et 9 cm de hauteur contenant du 2',5'-ADP Sépharose 4B était régénérée avec un tampon 0,1 M d'acétate de sodium/0,1 M de NaCl à pH 4,5 pendant 25 min avec un débit de 1ml/min, puis avec un tampon 0,1 M de Tris-HCl/0,1 M de NaCl à pH 8,5 pendant 25 min avec le même débit. Cette procédure était répétée deux autres fois. Par la suite, la colonne était équilibrée avec le tampon d'équilibration 50 mM de phosphate de potassium/200 mM de KCl à pH 7,5 avec un débit de 0,5 ml/min toute la nuit.

Le lendemain, 2 ml de microsomes solubilisés (voir 10.1), correspondant à 6,48 mg de protéines, étaient utilisés afin d'être injectés sur la colonne d'affinité dont le programme FPLC consistait à équilibrer la colonne avec le tampon d'équilibration contenant 1 mM de DTT fraîchement ajouté de 0 à 30 min, l'injection se faisait de 30 à 33 min, de 33 à 155 min l'élution se poursuivait avec le même tampon, de 155 à 275 min l'élution se faisait avec le tampon d'équilibration contenant le 1 mM de DTT et 5 mM de 2'AMP fraîchement ajouté, et de 275 à 310 min l'élution se terminait avec le tampon d'équilibration contenant le 1 mM de DTT. Le débit était constant avec 1 ml/min et les fractions étaient collectées à raison de 6 ml par fraction.

Les fractions correspondant au volume mort de la colonne étaient concentrées jusqu'à un volume de 2 ml par ultrafiltration sur une membrane filtrante Omega de 3 kDa (Filtron) avec une cellule Amicon d'une capacité de 50 ml (Waters Millipore). De la même façon, les fractions correspondant au retentat étaient concentrées jusqu'à un volume de 2 ml. Chacune des fractions était testée pour l'activité enzymatique de la même façon que celle expliquée au point 7.2. Cependant, la concentration finale dans le mélange réactionnel était de 0,1% pour le Brij 35, 10 μ M pour le FAD et le FMN, 1 mM pour le NADPH, et 1mM de DTT dans un volume total de 1 ml. La réaction était initiée par l'ajout du NADPH. Un contrôle était utilisé pour vérifier l'activité de ce système, il consistait à bouillir l'échantillon testé durant 20 min dans un bain d'eau. L'essai de l'activité enzymatique était fait en duplicata, tout comme le contrôle. L'analyse des réactions se faisait de la même manière que celle mentionnée au point 7.3.

14.0 Dosage du contenu protéique

Le contenu protéique était déterminé avec la méthode développée par Lowry *et al.* (1951) utilisant le réactif de phénol de Folin & Ciocalteu (Sigma). La courbe de référence était établie avec l'albumine bovine (Sigma).

Résultats

1.0 Isolement, purification et caractérisation du 2 α -hydroxytrichodiène et du 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol

1.1 2 α -hydroxytrichodiène

Une grande quantité de l'extrait du milieu de production de *F. culmorum* était nécessaire afin d'isoler le 2 α -hydroxytrichodiène étant donné sa très faible accumulation dans le milieu de culture. La disponibilité de ce composé synthétisé dans notre laboratoire par Anastasia Nikolakakis facilitait la recherche de ce trichothécène comme métabolite naturel produit par cette moisissure. Ainsi, nous possédions son temps de rétention sous différentes conditions au HPLC et la caractérisation de sa structure chimique déterminée par RMN.

Ainsi, l'extraction du milieu de production avec de l'acétate d'éthyle a permis, entre autres, d'extraire les trichothécènes contenus dans ce milieu. Cet extrait cellulaire était tout d'abord fractionné en plusieurs injections au HPLC préparatif étant donné sa grande quantité puisque pour obtenir une bonne séparation des composés, la colonne ne peut supporter plus de 250 mg. La Figure 17 montre le chromatogramme de l'extrait du milieu de production où la surface sous les deux pics qui se chevauchent de 51,32 à 52,82 min correspond au t_R du 2 α -hydroxytrichodiène synthétisé. Ainsi, l'aire sous ces pics ne représente seulement que 0,70 % de l'ensemble de l'aire contenue sous la totalité des pics, ce qui démontre la très faible accumulation de ce métabolite dans le milieu de culture. Après avoir combiné toutes les fractions recueillies entre 49 et 60 min comprenant le 2 α -hydroxytrichodiène un second fractionnement au HPLC semi-préparatif était nécessaire afin de bien séparer les deux petits pics visibles sur le HPLC préparatif. Ainsi, à la Figure 18, deux pics majoritaires à 52,5 et 55,8 min ont élués et ce dernier correspond au temps de rétention du 2 α -hydroxytrichodiène synthétisé. Après avoir isolé et purifié ce pic par une autre injection au HPLC semi-préparatif, il n'y avait pas assez de ce composé pour l'analyser par RMN.

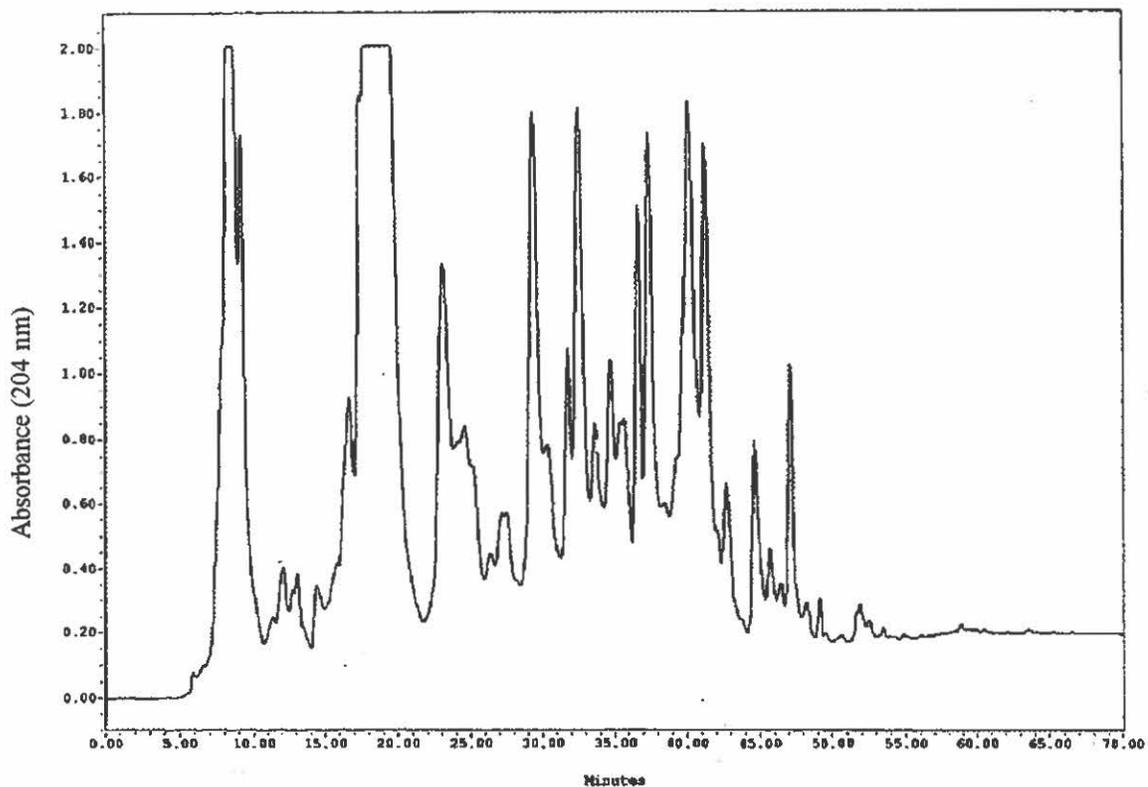


Figure 17: Chromatogramme de l'extrait du milieu de production (233 mg) de *F. culmorum* fractionné avec le HPLC préparatif. Une colonne Whatman partisol 10 ODS-2 (22 x 500 mm) était utilisée dont l'éluion se faisait avec un gradient linéaire de 50 min avec une concentration initiale de 40% méthanol, 60% eau et une concentration finale de 100% méthanol qui était maintenue durant 20 min dont le débit était de 18 ml/min. La surface sous les deux pics qui se chevauchent de 51,32 à 52,82 min correspond au t_R du 2 α -hydroxytrichodiène synthétisé.

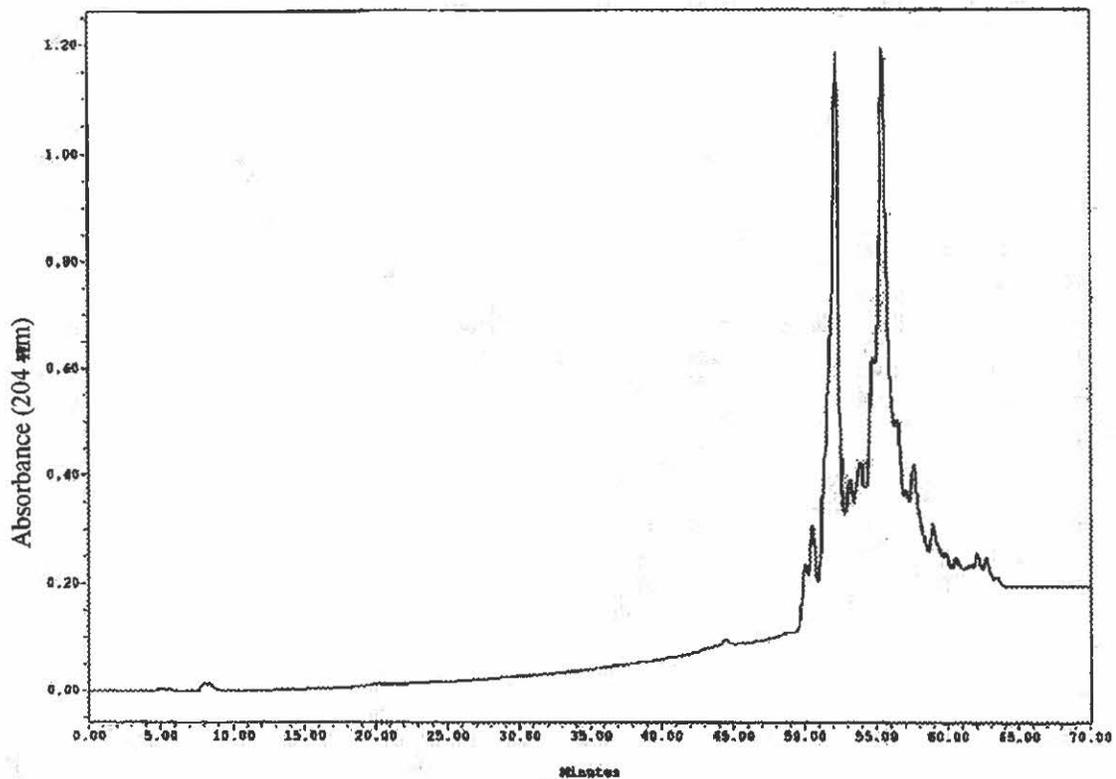


Figure 18: Chromatogramme de la région 49 à 60 min collectée au HPLC préparatif fractionnée avec le HPLC semi-préparatif. Deux colonnes Whatman partasil 10 ODS-2 (9,4 x 250 mm) montées en série étaient utilisées, l'éluion se faisait avec un gradient linéaire de 50 min avec une concentration initiale de 40% méthanol, 60% eau et une concentration finale de 100% méthanol qui était maintenue durant 20 min dont le débit était de 3 ml/min. Le t_R à 55,8 min correspond au 2 α -hydroxytrichodiène synthétisé.

Nous avons donc décidé d'utiliser la méthode de dilution radioactive. Ainsi, une autre production des trichothécènes a été faite afin de ré-isoler le pic à 55,8 min. Cette fois-ci, dans le but d'identifier rigoureusement la présence possible du 2 α -hydroxytrichodiène dans ce pic HPLC, une acétylation de ce dernier avec [1'-¹⁴C]anhydride acétique a été faite. Cette réaction, illustrée à la Figure 19, consiste à obtenir un groupement acétyle radiomarqué sur la fonction hydroxyle du 2 α -hydroxytrichodiène afin de changer son temps de rétention et d'ainsi permettre de détecter la radioactivité dans cette molécule formée, soit le 2 α -[1'-¹⁴C]acétoxytrichodiène. La fonction acétoxy (R-OCOCH₃) est moins polaire que la fonction hydroxyle (R-OH) et change ainsi la polarité de la molécule, donc du temps de rétention au HPLC avec la colonne à phase inverse. Cette méthode est en quelque sorte une sonde qui sert à détecter le 2 α -hydroxytrichodiène présent en très faible quantité.

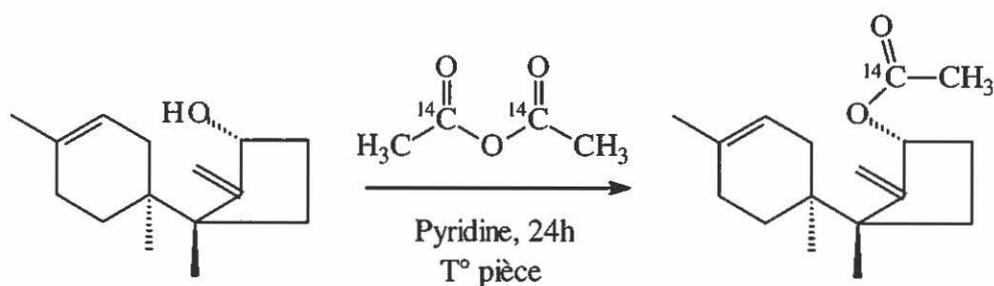


Figure 19: Réaction d'acétylation du 2 α -hydroxytrichodiène avec le [1'-¹⁴C]anhydride acétique.

Ainsi, le mélange réactionnel était fractionné au HPLC analytique utilisant 80% de méthanol et 20% d'eau et le petit pic obtenu à 56 min correspondait au temps de rétention du 2 α -acétoxytrichodiène synthétisé tandis que le pic majoritaire à 38 min correspondait à celui du 2 α -hydroxytrichodiène synthétisé, donc du produit de départ pour la réaction d'acétylation (Figure 20). Afin de s'assurer qu'il n'y avait plus de 2 α -hydroxytrichodiène présent dans le produit de départ récupéré, une deuxième réaction d'acétylation a été effectuée sous les mêmes conditions. Le chromatogramme obtenu n'a montré aucun pic à 56 min et aucune radioactivité n'a été détectée à ce temps de rétention. Ceci démontre que le 2 α -hydroxytrichodiène était présent en très faible quantité dans le pic HPLC.

Le pic à 56 min était collecté afin de compter la radioactivité qui était de 2904 dpm. Afin de s'assurer que cette radioactivité était distribuée symétriquement, ce pic était déposé sur une plaque HPTLC, élué avec de l'acétate d'éthyle-hexane (4:1), puis analysé avec le système Bioscan (Figure 21). Un seul pic radioactif symétrique a été détecté par l'appareil possédant un R_f de 0,81 similaire à celui du 2 α -acétoxytrichodiène synthétisé. De plus, pour s'assurer que le composé était pur et identique au métabolite synthétisé, il était purifié au HPLC analytique sous trois différentes conditions d'élution à 1 ml/min, soit 85% méthanol, 15% eau (t_R = 32 min), puis avec le programme A (t_R = 61 min), et finalement avec 80% méthanol, 20% eau (t_R = 56 min). À chacun des temps de rétention correspondant au 2 α -acétoxytrichodiène synthétisé, indiqués entre parenthèse, un pic a été détecté avec la présence de radioactivité d'une valeur de 2860 dpm, 2392 dpm, et 2049 dpm respectivement. En se basant sur l'aire sous le pic au HPLC analytique de quantités connues de 2 α -acétoxytrichodiène synthétisé, une quantité de 0,3 μ g/g de mycélium/jour est estimée pour l'accumulation du 2 α -hydroxytrichodiène comme métabolite naturel dans le milieu de production. Par ailleurs, plusieurs tentatives infructueuses ont été réalisées pour l'isolement et la purification du 2 α -hydroxytrichodiène à partir des cellules, c'est-à-dire l'extraction du mycélium avec des solvants organiques.

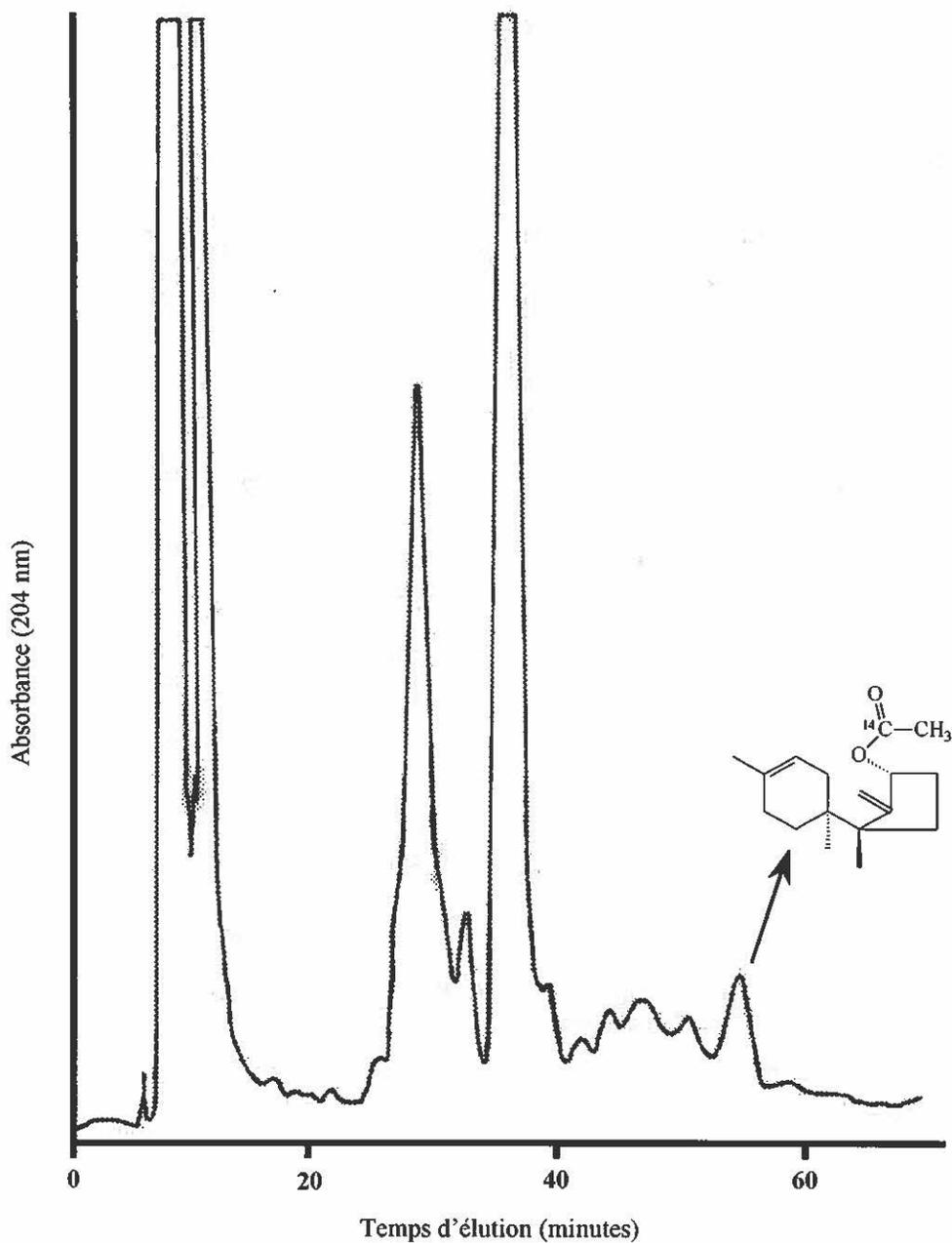


Figure 20: Chromatogramme de la réaction d'acétylation du pic à 55,8 min provenant du HPLC semi-préparatif fractionnée avec le HPLC analytique. Deux colonnes Whatman partisil 10 ODS-2 (4,6 x 250 mm) montées en série étaient utilisées et l'éluion se faisait dans une condition isocratique de 80% méthanol et 20% eau à 1 ml/min.

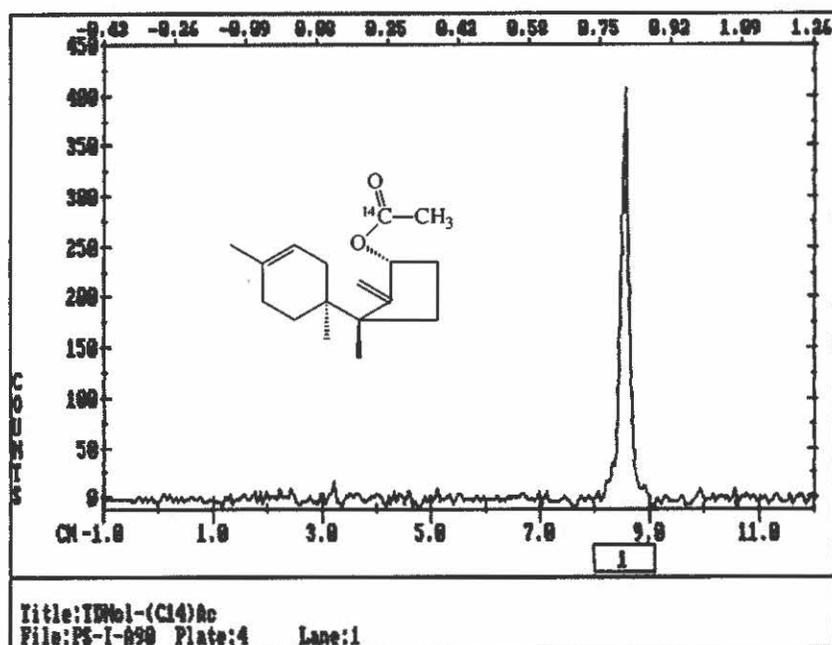


Figure 21: Bioscan du 2α -[1'- ^{14}C]-acétoxytrichodiène provenant de l'acétylation du 2α -hydroxytrichodiène avec le [1'- ^{14}C]anhydride acétique. L'élué avec le mélange de solvant acétate d'éthyle-hexane (4:1) sur une plaque HPTLC de 10 x 10 cm a révélé la présence d'un seul pic radioactif symétrique.

1.2 12,13-Époxy-9,10-trichoène-2-ol

Sur le chromatogramme à la Figure 18 qui représente l'extrait de la région 49 à 60 min provenant du HPLC préparatif de *F. culmorum* fractionné avec le HPLC semi-préparatif, il y a un pic majoritaire à 52,5 min situé non loin du 2α -hydroxytrichodiène dont la quantité était suffisante pour une analyse par RMN. C'est ainsi que le spectre RMN des protons, analysé par le Dr Françoise Sauriol, a démontré qu'il s'agissait du 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol dont la structure chimique est illustrée à la Figure 22. Ce spectre est identique à celui du composé synthétisé dans notre laboratoire par Anastasia Nikolakakis et à celui publié par l'accumulation de ce composé dans le milieu de culture

qui était due à un traitement par l'inhibiteur de monooxygénase ancymidol (Zamir *et al.*, 1991a). Son accumulation dans le milieu de culture sans inhibiteur, tout comme le 2 α -hydroxytrichodiène, est très faible car la surface sous les deux pics qui se chevauchent de 51,32 à 52,82 min provenant de l'extrait cellulaire fractionné au HPLC préparatif ne représente seulement 0,70 % de l'ensemble de l'aire contenue sous la totalité des pics. En se basant sur une quantité de 1 mg de 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol isolé de 5 litres du milieu de culture, une quantité de 1,5 $\mu\text{g/g}$ de mycélium/jour est estimée pour l'accumulation de ce métabolite naturel dans le milieu de production.

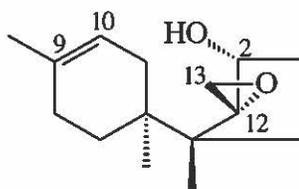


Figure 22: Structure chimique du métabolite 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol isolé.

2.0 Synthèse du substrat

L'utilisation d'un substrat radiomarqué pour une étude enzymatique possède l'avantage d'être très spécifique car l'activité est mesurée par la formation du produit de la réaction et est très sensible car une infime quantité de ce dernier peut être détectée. Ainsi, ceci facilite grandement la détection d'une faible activité enzymatique dans un extrait cellulaire, par exemple, lorsque les conditions maximales de la réaction (température, pH, cofacteurs, temps d'incubation, ...etc) ne sont pas encore connues.

Au tout début de cette étude, nous possédions du trichodiène marqué au ^{14}C à la position C-16 qui avait été synthétisé dans notre laboratoire (Zamir et Huang, 1992a) puisque le trichodiène radiomarqué (ou non) n'est pas disponible commercialement. Ainsi, des travaux préliminaires pour la détection de l'activité d'oxygénation du

trichodiène chez *F. culmorum* ont été faits avec ce substrat. Cependant, étant donné la faible quantité qu'il restait nous avons dû avoir recours à la production de trichodiène radiomarqué en alimentant des cultures de *F. culmorum* avec de l'acétate marqué au ^{14}C à toutes les positions et traitées avec l'inhibiteur de monooxygénase ancymidol. Cette méthode était très rapide comparativement à la synthèse du $[16\text{-}^{14}\text{C}]$ trichodiène qui est très fastidieuse. De plus, le faible rendement obtenu pour le substrat et sa faible activité spécifique n'était pas envisageable pour cette étude enzymatique. Par la suite, nous avons décidé d'utiliser le $[11\alpha, 11\beta\text{-}^2\text{H}_2]15\text{-}^3\text{H}$ -trichodiène synthétisé par Marie-Claude Rousseau d'après la méthode récemment soumise pour publication (Zamir *et al.*, 1999b). Avant d'utiliser ce substrat synthétisé, il fallait s'assurer qu'il était pur radioactivement. Ainsi, l'élution de ce composé avec le mélange de solvant acétate d'éthyle-hexane (4:1) sur une plaque HPTLC analysé par le système Bioscan a révélé la présence d'un seul pic radioactif symétrique avec un R_f de 0,92 (Figure 23).

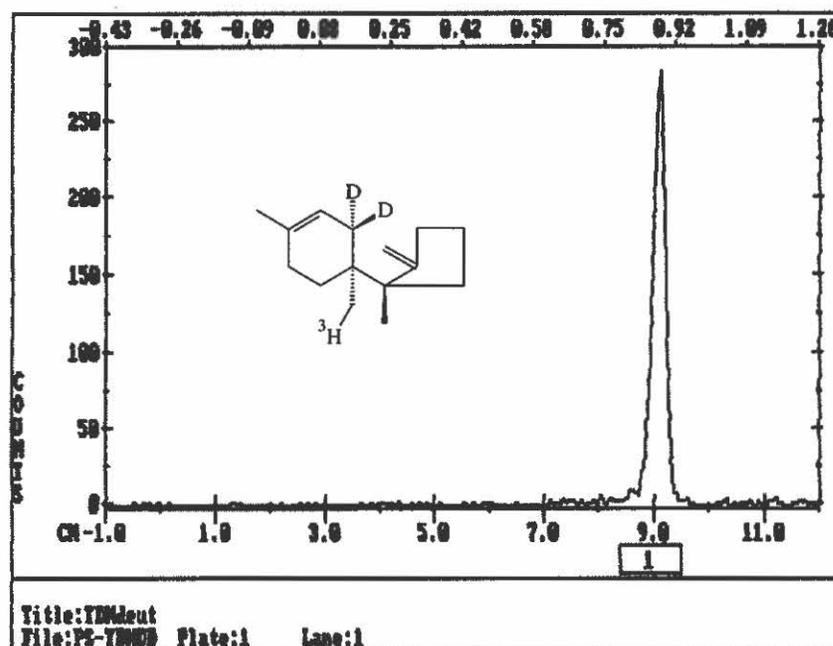


Figure 23: Bioscan du substrat $[11\alpha, 11\beta\text{-}^2\text{H}_2]15\text{-}^3\text{H}$ -trichodiène synthétisé. L'élution avec le mélange de solvant acétate d'éthyle-hexane (4:1) sur une plaque HPTLC de 10 x 10 cm a révélé la présence d'un seul pic radioactif symétrique (sur la structure chimique, D: ^2H).

3.0 Oxygénation du $[11\alpha, 11\beta\text{-}^2\text{H}_2]15\text{-}^3\text{H}$ -trichodiène par l'extrait cellulaire

Avec l'isolement du 2α -hydroxytrichodiène comme métabolite naturel chez *Fusarium culmorum* dans ce travail et la preuve de son incorporation dans les deux trichothécènes majeurs 3-acétyldésoxynivalénol et sambucinol chez cette même espèce (Zamir *et al.*, 1999a), l'étape suivante était de déterminer l'existence possible d'une activité enzymatique responsable de l'oxygénation du trichodiène en position C-2.

Ainsi, un test enzymatique basé sur celui utilisé pour l'oxygénation de l'isotrichodermine en position C-15 par les microsomes chez *F. culmorum* (Zamir *et al.*, 1996) a été mis au point. En tenant compte du fait que le substrat $[11\alpha, 11\beta\text{-}^2\text{H}_2]15\text{-}^3\text{H}$ -trichodiène est un composé insoluble en milieu aqueux, il a fallu incorporer le même détergent utilisé dans la preuve de l'incorporation du trichodiène dans les trichothécènes chez *F. culmorum* (Zamir *et al.*, 1989). Étant donné la nécessité du NADPH comme cofacteur lors des activités enzymatiques pour l'oxygénation de l'isotrichodermine (Zamir *et al.*, 1996) et l'époxydation d'un analogue du trichodiène en position C-12, C-13 (Gledhill *et al.*, 1991) chez *F. culmorum*, celui-ci était ajouté à la concentration finale de 1 mM au mélange réactionnel généralement employée dans de tel système pour l'étude des monooxygénases. Une étude préliminaire de l'oxygénation du trichodiène dans l'extrait cellulaire a permis d'établir le temps d'incubation à 35 minutes afin d'obtenir le maximum du produit de la réaction.

Une fois l'incubation et l'extraction terminée, l'évaporation devait être réalisée avec beaucoup de précaution à cause de la très grande volatilité du trichodiène. Nonobstant, environ la moitié de la radioactivité est perdue à cette étape. Ce test enzymatique est très fastidieux à réaliser puisque l'utilisation d'un substrat radioactif demande une extraction, une évaporation, une injection au HPLC, et le comptage de la radioactivité afin de déterminer l'activité enzymatique. Ainsi, il est difficile de faire plusieurs essais enzymatiques dans une journée. Cependant, la très grande spécificité et sensibilité font de ce test un outil fort efficace.

Pour déterminer l'existence possible d'une activité enzymatique responsable de l'oxygénation du trichodiène en position C-2, nous avons tout d'abord utilisé un extrait cellulaire de *F. culmorum*. Ainsi, à la Figure 24, le profil de la radioactivité au HPLC analytique montre la formation d'un métabolite avec un temps de rétention de 50 min qui co-élu avec le 2 α -hydroxytrichodiène synthétisé. L'activité enzymatique détectée était de 23,4 dpm/min/mg de protéine dans l'essai par rapport à 800 000 dpm du substrat [11 α , 11 β -²H₂]15-³H-trichodiène donné au test enzymatique. Un contrôle où l'extrait cellulaire était préalablement bouilli 20 minutes avant le test enzymatique n'a montré aucune formation de métabolite.

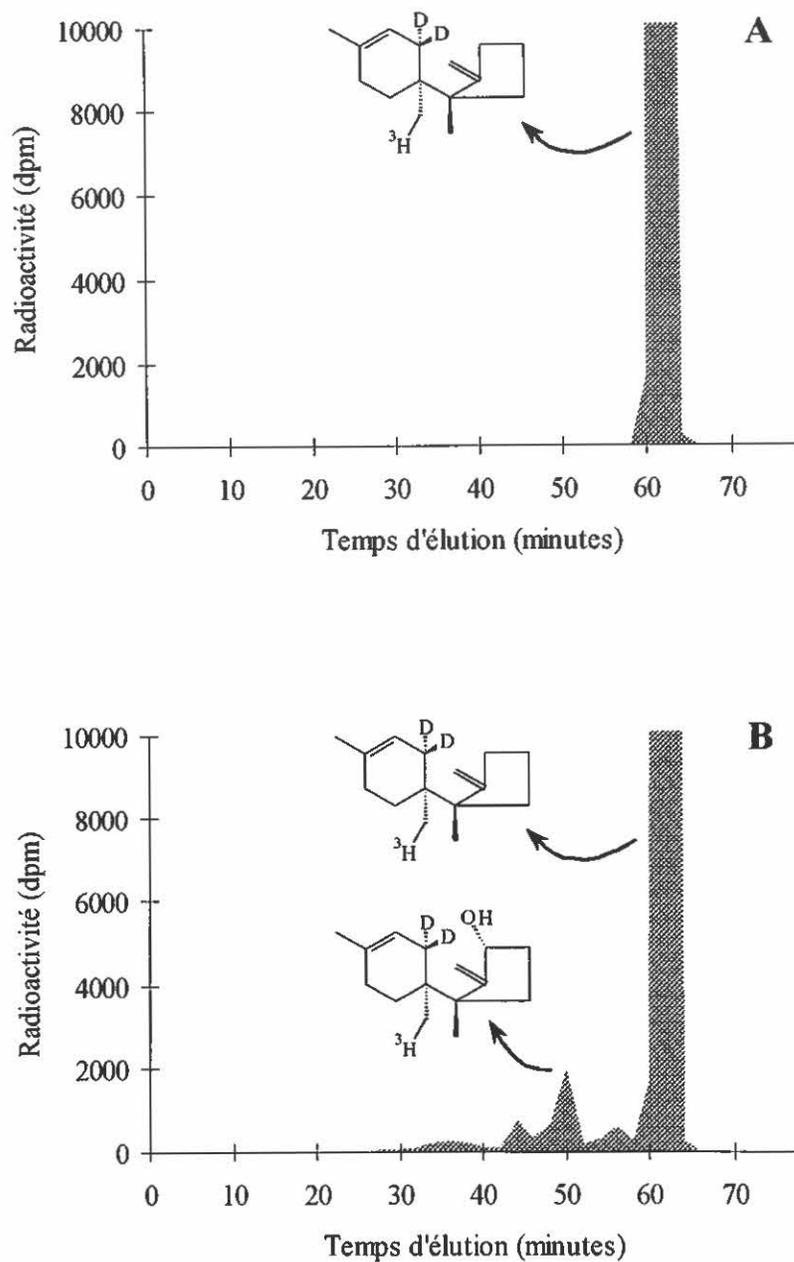


Figure 24: Profil au HPLC analytique de la réaction d'oxygénation par l'extrait cellulaire. Le $[11\alpha, 11\beta\text{-}^2\text{H}_2]15\text{-}^3\text{H}$ -trichodiène (0,35 μCi) était incubé avec l'extrait cellulaire en présence de 1 mM de NADPH, 1 mM de DTT, et 0,01% de Brij 35 durant 35 min à 25°C avec une agitation de 220 rpm. *A* Un contrôle où l'extrait cellulaire était bouilli 20 min ne montre aucune activité d'oxygénation. *B* Le profil de la radioactivité au HPLC analytique de l'essai montre la formation du 2 α -hydroxy- $[11\alpha, 11\beta\text{-}^2\text{H}_2]15\text{-}^3\text{H}$ -trichodiène (sur les structures chimiques, D: ^2H).

4.0 Localisation intracellulaire de l'activité enzymatique

Avec la certitude de la présence d'une activité d'oxygénation du trichodiène dans l'extrait cellulaire, l'étape suivante était de localiser le site intracellulaire de cette activité. Une série de centrifugations différentielles a été effectuée pour la préparation des fractions post-mitochondriales, c'est-à-dire soluble et microsomal, où la majorité des cytochromes P450 monooxygénases est retrouvée.

La première centrifugation à 13 000 x g est suffisante pour la récupération du surnageant dépourvu des débris membranaires résultant du bris de la cellule ainsi que des mitochondries (Ozols, 1990). Par ailleurs, le culot peut contenir des lysozymes, des peroxisomes, des appareils de Golgi, et du réticulum endoplasmique (Ozols, 1990). Une deuxième centrifugation à 120 000 x g de ce surnageant a permis de récupérer le culot contenant les microsomes et le surnageant contenant le cytosol. Les microsomes sont en fait de petites vésicules délimitées par une membrane et dérivées du réticulum endoplasmique lors d'un fractionnement cellulaire.

Il aurait été possible de déterminer la pureté des préparations par la mesure de l'activité d'enzymes marqueurs spécifiques à des organites (Storrie et Madden, 1990). Ainsi, la cytochrome-c oxydase est un marqueur pour les mitochondries, la β -hexosaminidase et la β -galactosidase pour les lysosomes, la horseradish peroxydase pour les endosomes, l'alkaline phosphodiesterase I pour la membrane plasmique, la α -mannosidase II pour l'appareil de Golgi, la catalase pour les peroxisomes, la lactate déhydrogénase pour le cytosol, et la NADPH/cytochrome-c réductase pour le réticulum endoplasmique (Storrie et Madden, 1990).

L'analyse des fractions sous-cellulaires, présentés au Tableau 2, indique que l'activité enzymatique est majoritairement retrouvée dans les microsomes avec 56,5 dpm de 2α -hydroxy-[11 α , 11 β - 2 H $_2$]15- 3 H-trichodiène formé par min d'incubation par mg de protéine comparativement à 7,1 dpm/min/mg de protéine pour la fraction soluble. Ainsi,

l'activité dans les microsomes est augmentée d'un facteur 2,4 par rapport à celle contenue dans l'extrait cellulaire qui est de 23,4 dpm/min/mg de protéine. La faible activité enzymatique détectée dans la fraction soluble peut s'expliquer par une contamination du surnageant par les microsomes lors de la préparation de ces fractions ou par la présence d'une monooxygénase non-spécifique dans le cytosol dont le trichodiène n'est pas son substrat naturel mais qui est capable de catalyser cette réaction.

Tableau 2: Localisation intracellulaire de l'activité enzymatique catalysant l'oxygénation du trichodiène menant au 2 α -hydroxytrichodiène

Fraction	Activité enzymatique* (dpm/min/mg protéine)
Extrait Cellulaire	23,4
Soluble	7,1
Microsomal	56,5

*L'activité est exprimée en dpm de 2 α -hydroxy-[11 α , 11 β -²H₂, 15-³H]trichodiène formé par min d'incubation par mg de protéine dans les fractions extrait cellulaire, soluble et microsomal testées. Chacune de ces fractions contenaient 800 000 dpm de [11 α , 11 β -²H₂]15-³H-trichodiène avec une concentration finale de 0,01% de Brij 35, 1 mM de NADPH, 1 mM de DTT, et 1,71 mg/ml de protéine respectivement. Le temps d'incubation était de 35 min à 25°C avec une agitation de 220 rpm.

5.0 Effets des cofacteurs sur l'activité enzymatique dans les microsomes

Avant de poursuivre la purification de cette monooxygénase contenue dans les microsomes, il était préférable à ce stade de réussir à augmenter son activité afin d'être en mesure de faciliter sa détection dans les étapes ultérieures. Par conséquent, l'ajout de cofacteurs généralement nécessaires à ce type de réaction de monooxygénation a été étudié pour en mesurer leurs effets sur l'activité (Tableau 3). Par ailleurs, le type de cofacteurs nécessaires à la réaction permet de caractériser en partie l'enzyme étudiée.

En débutant avec une activité de 56,5 dpm/min/mg de protéine dans les microsomes où 1 mM de NADPH était présent (pour les besoins de comparaison cette valeur est établie à 100% comme activité enzymatique relative), la première vérification consistait à enlever ce cofacteur afin de déterminer son influence sur l'activité. Le résultat obtenu indique clairement la nécessité du NADPH comme cofacteur pour cette réaction enzymatique puisqu'à peine 8% de l'activité a été détectée sans l'ajout de celui-ci. Le NADH ne peut remplacer le NADPH à une concentration de 1 mM car seulement 35% de l'activité est présente, de plus, il n'augmente pas l'activité en présence de NADPH.

L'ajout de 10 μ M de FAD a eu une influence sur l'activité en présence de NADPH, tout comme l'ajout de 10 μ M de FMN. Une augmentation respective de 78% et 72% est observée donc l'influence des deux cofacteurs peut être considérée comme similaire. Finalement, l'ajout simultané de ceux-ci en présence de NADPH a permis de doubler l'activité initiale contenue dans les microsomes. Il est à noter que l'utilisation des concentrations pour tous ces cofacteurs est basée sur celles généralement employées pour l'étude de tel système enzymatique.

Tableau 3: Effets des cofacteurs sur l'activité d'oxygénation du trichodiène contenue dans les microsomes

Cofacteur ajouté	Activité enzymatique relative* (%)
Contrôle (aucun)	8
NADPH 1mM	100
NADH 1mM	35
NADPH 1mM + NADH 1mM	101
NADPH 1mM + FAD 10 μ M	178
NADPH 1mM + FMN 10 μ M	172
NADPH 1mM + FAD 10 μ M + FMN 10 μ M	202

*L'activité enzymatique relative est exprimée en fonction de la quantité de 2 α -hydroxy-[11 α , 11 β -²H₂]15-³H-trichodiène formée (en dpm) dans les microsomes (1 mM NADPH) par min d'incubation par mg de protéine. La valeur de base était de 56,5 dpm/min/mg de protéine. Chacun de ces essais contenaient 800 000 dpm de [11 α , 11 β -²H₂]15-³H-trichodiène avec une concentration finale de 0,01% de Brij 35, 1 mM de DTT, 2,0 mg/ml de protéines, et la concentration du ou des cofacteur(s) indiqué(s). Le temps d'incubation était de 35 min à 25°C avec une agitation de 220 rpm.

6.0 Solubilisation des microsomes avec le détergent Brij 35

L'activité enzymatique contenue dans les microsomes signifie que l'enzyme responsable peut être une protéine membranaire. Donc pour poursuivre la purification, la solubilisation de la membrane est nécessaire. Un détergent est communément utilisé pour réaliser cette tâche, c'est-à-dire le Brij 35 (un choix logique puisqu'il est utilisé à une concentration finale de 0,01% dans le mélange réactionnel pour solubiliser le substrat). Ainsi, après avoir solubilisé les microsomes avec une concentration finale de 0,17% du détergent, l'activité enzymatique était de 119,1 dpm/min/mg de protéine comparativement à 56,5 dpm/min/mg de protéine dans les microsomes non-solubilisés, soit une augmentation de cette activité d'un facteur 2,1. Ce résultat démontre clairement que la protéine a été solubilisée avec succès.

7.0 Détection d'hémoprotéines dans les microsomes solubilisés

La nature possible de l'enzyme catalysant l'oxygénation du trichodiène en position C-2 contenue dans les microsomes solubilisés, en tant que cytochrome P450 monooxygénase, peut être détectée en effectuant un gel de polyacrylamide natif suivi d'une coloration à la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine / H₂O₂. Cette coloration est basée sur le fait que l'ion ferrique complexé à l'hème du cytochrome P450 est capable d'oxyder la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine en présence de H₂O₂ développant ainsi une couleur bleue visible sur le gel.

Un gel natif préparatif contenant 8% de polyacrylamide était réalisé afin de permettre la séparation d'une grande quantité de protéines (128 µg) sur une longue distance. Une fois la migration de 3 heures à 200 volts réalisée, la partie du gel contenant les marqueurs de poids moléculaire était découpée afin d'être colorée au bleu de Coomassie R-250. Par la suite, le gel restant était déposé dans la solution contenant la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine pour permettre la fixation de ce composé dans le gel. Après

une période de 2 heures, le peroxyde d'hydrogène était ajouté et la couleur était visible après seulement 3 minutes en augmentant d'intensité dans les 30 minutes avec le fond du gel qui demeurait clair. Le gel était ensuite placé dans la solution d'arrêt pour enlever tout précipité de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine encore présent dans le gel. Le résultat obtenu, illustré à la Figure 25, démontre la présence d'une bande majoritaire située à environ la moitié du gel et une bande minoritaire dans le bas. La bande minoritaire dans le bas du gel, qui correspond au front de migration, semble être le noyau hème détaché de la protéine. Ainsi, les microsomes solubilisés semblent contenir seulement une hémoprotéine avec l'utilisation de ce test qui est reconnu pour être très sensible.



Figure 25: Électrophorèse en gel de polyacrylamide natif 8% des microsomes solubilisés. Le gel était coloré à la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine / H₂O₂ pour la détection d'hémoprotéines. Une quantité de 128 µg de protéine était déposée dans le puits et une migration pendant 3 heures à 200 volts était réalisée.

8.0 Stabilité de l'activité enzymatique contenue dans les microsomes solubilisés

Une étude sur la stabilité de l'activité enzymatique a été réalisée au cours du temps à une température de 4-6°C correspondant à celle de la chambre froide où le système FPLC est installé. Ceci s'est fait en fonction de pouvoir utiliser le FPLC pour la suite de la purification de l'enzyme dont la durée des manipulations avec un tel système s'échelonne sur plusieurs heures.

Ainsi, les résultats illustrés à la Figure 26 démontrent que l'activité enzymatique a diminuée de 33% en 9,5 heures d'entreposage pour s'établir à 67% de l'activité initiale. Ce pourcentage est convenable pour détecter l'activité enzymatique après cette période de temps qui correspond à une injection au FPLC des microsomes solubilisés jusqu'à l'analyse des fractions concentrées. Après une durée d'entreposage de 23,75 heures des microsomes solubilisés à 4-6°C, l'activité détectée était seulement de 37% comparativement à l'activité initiale. Ces résultats démontrent que l'enzyme responsable de l'oxygénation du trichodiène n'est pas stable à des températures avoisinant le point de congélation limitant ainsi la durée des manipulations pour la purification de cette monooxygénase. Il est évident qu'une succession d'étapes de purification est alors à proscrire. Par contre, l'activité de celle-ci est stable durant deux mois lorsque les microsomes sont entreposés à -80°C.

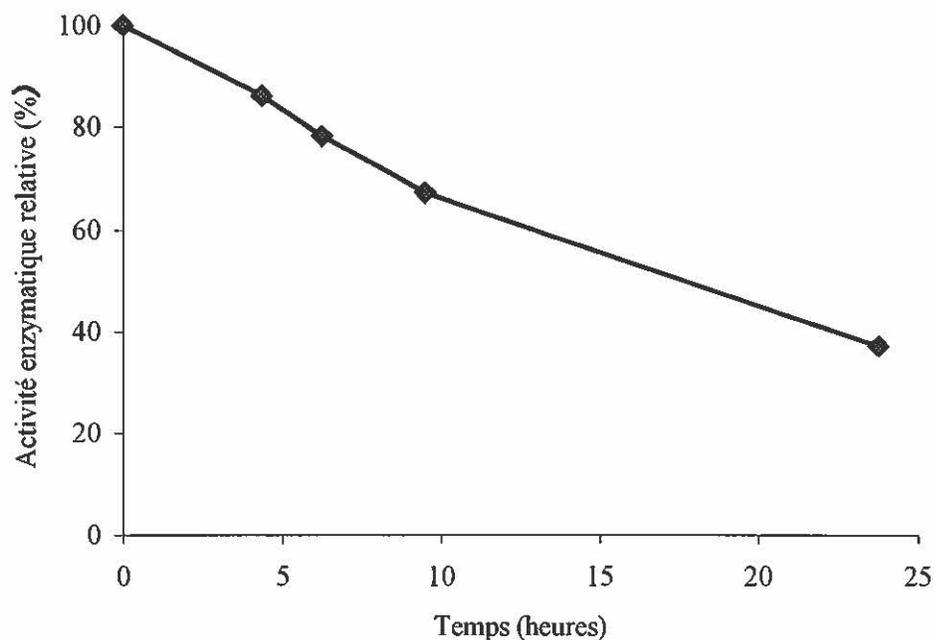


Figure 26: Stabilité de l'activité de monooxygénation par les microsomes solubilisés entreposés à une température de 4-6°C. L'activité enzymatique relative est exprimée en fonction de la quantité de 2 α -hydroxy-[11 α , 11 β -²H₂]15-³H-trichodiène formée (en dpm) par min d'incubation par mg de protéine au temps zéro heure. Cette valeur était de 119,1 dpm/min/mg de protéine. Chacun de ces essais contenaient 800 000 dpm de [11 α , 11 β -²H₂]15-³H-trichodiène avec une concentration finale de 0,1% de Brij 35, 1 mM de DTT, 1 mM de NADPH, 10 μ M de FAD et 10 μ M de FMN, 1,62 mg/ml de protéine. Le temps d'incubation était de 35 min à 25°C avec une agitation de 220 rpm.

9.0 Chromatographie d'affinité des microsomes solubilisés

Afin de minimiser le temps de manipulation pour purifier la monooxygénase, une chromatographie d'affinité était une alternative intéressante car elle permettait de fixer directement l'enzyme d'intérêt sur une colonne. Ainsi, la colonne d'affinité utilisée était la 2',5'-ADP Sépharose 4B dont le 2',5'-ADP est un analogue structural du NADPH. Immobilisée sur le Sépharose 4B, cette structure analogue fixe et immobilise les enzymes nécessitant ce cofacteur.

Les microsomes solubilisés possédant 6,48 mg de protéine ont été fractionnés avec cette colonne, et l'élution se faisait selon le programme FPLC décrit dans l'approche expérimentale. Avec le chromatogramme obtenu (Figure 27), les fractions correspondant au volume mort étaient concentrées de même que celles correspondant au retentat afin de déterminer l'activité enzymatique de la monooxygénase. Or, aucune activité n'a été détectée dans ces fractions concentrées, ni en combinant les deux fractions ensemble. Le résultat demeurait toujours négatif après la réalisation de plusieurs chromatographies. L'ajout du détergent Brij 35 dans le tampon d'élution, et l'augmentation de la concentration du 2'AMP de 5 à 10 mM n'ont pas permis de récupérer l'activité dans l'une ou l'autre des fractions. En sachant que l'enzyme est toujours active après le laps de temps nécessaire à la chromatographie d'affinité, ce résultat peut supposer que cette monooxygénase est constituée de domaines qui ont été séparés durant le passage dans la colonne.

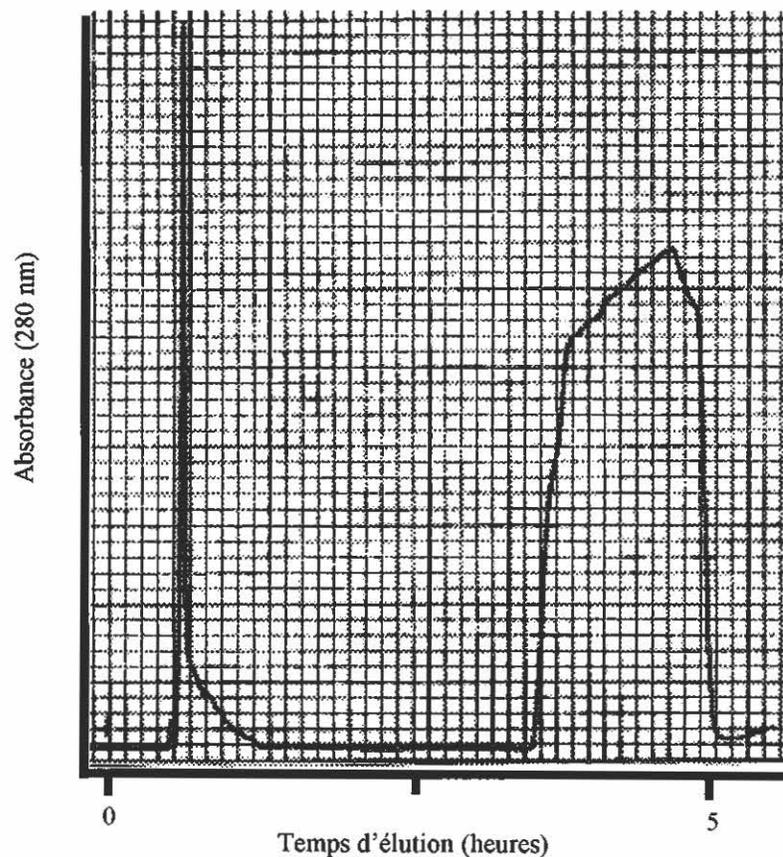


Figure 27: **Chromatographie d'affinité des microsomes solubilisés avec la colonne 2',5'-ADP Sépharose 4B.** Les microsomes solubilisés (6,48 mg de protéine) étaient fractionnés avec la colonne d'affinité dont le programme FPLC consistait à équilibrer la colonne avec le tampon d'équilibration 50 mM de phosphate de potassium/200 mM de KCl à pH 7,5 contenant 1 mM de DTT fraîchement ajouté de 0 à 30 min, l'injection se faisait de 30 à 33 min. L'élution se poursuivait avec le même tampon de 33 à 155 min. De 155 à 275 min, l'élution se faisait avec le tampon d'équilibration contenant le 1 mM de DTT et 5 mM de 2'AMP fraîchement ajouté. L'élution se terminait avec le tampon d'équilibration contenant le 1 mM de DTT de 275 à 310 min. Le débit était constant avec 1 ml/min et les fractions étaient collectées à raison de 6 ml par fraction.

10.0 Isolement de la monooxygénase catalysant l'hydroxylation en position C-2 du trichodiène chez *F. culmorum*

Le résumé de l'isolement de cette monooxygénase est indiqué au Tableau 4. L'extrait cellulaire de la souche HLX 1503 de *Fusarium culmorum* a démontré sa capacité à oxygéner le $[11\alpha, 11\beta\text{-}^2\text{H}_2]15\text{-}^3\text{H}$ -trichodiène avec une activité spécifique de 23,4 dpm de 2α -hydroxy- $[11\alpha, 11\beta\text{-}^2\text{H}_2]15\text{-}^3\text{H}$ -trichodiène formé / min / mg de protéine. Après une série de centrifugations différentielles, l'activité a été retrouvée majoritairement dans les microsomes avec une activité spécifique de 56,5 dpm/min/mg de protéine, soit un facteur de purification de 2,4 pour cette étape. Par ailleurs, la perte de l'activité totale pour cette étape s'explique en partie par l'activité retrouvée dans la fraction soluble et par la présence possible d'enzymes protéolytiques relâchées des organites lors de l'homogénéisation du mycélium qui n'ont pu être complètement inhibées durant la préparation des fractions subcellulaires. La solubilisation des microsomes avec le détergent Brij 35 a permis d'augmenter l'activité spécifique à 119,1 dpm/min/mg de protéine, soit un facteur de purification de 5,1 comparativement à l'extrait cellulaire. De plus, l'activité totale 12 982 dpm/min/mg de protéine a presque été toute récupérée car elle était de 13 899 dpm/min/mg de protéine dans les microsomes et ceci avec un peu plus du double de l'activité spécifique.

Tableau 4: Isolement de la monooxygénase catalysant l'hydroxylation en position C-2 du trichodiène chez *Fusarium culmorum* HLX 1503

Étape	Protéine totale (mg)	Activité totale (dpm/min)	Activité spécifique* (dpm/min/mg de protéine)	Facteur de purification
Extrait cellulaire	990	23 166	23,4	—
Microsome	246	13 899	56,5	2,4
Microsome solubilisé avec Brij 35	109	12 982	119,1	5,1

*L'activité spécifique à chacune des étapes de purification est exprimée en dpm de 2 α -hydroxy-[11 α , 11 β -²H₂]¹⁵-³H-trichodiène formé par minute d'incubation par mg de protéine. Chaque fraction contenait 800 000 dpm de [11 α , 11 β -²H₂]¹⁵-³H-trichodiène avec une concentration finale de 0,01% de Brij 35 (0,17% pour les microsomes solubilisés), 1 mM de NADPH, 10 μ M de FAD et 10 μ M de FMN, 1 mM de DTT, et une concentration finale de protéine de 1,15 mg/ml pour l'extrait cellulaire, 2,0 mg/ml pour les microsomes, et 1,62 mg/ml pour les microsomes solubilisés. Le temps d'incubation était de 35 min à 25°C avec une agitation de 220 rpm.

Discussion

1.0 Le 2 α -hydroxytrichodiène: premier intermédiaire oxygéné post-trichodiène

Récemment, une étude a été effectuée dans notre laboratoire avec des isotopes stables et a prouvé rigoureusement les étapes post-trichodiène dont 2 α -hydroxytrichodiène étant le premier intermédiaire (Zamir *et al.*, 1999a). Ainsi, l'isolement du 2 α -hydroxytrichodiène à partir d'un extrait du milieu de production de *F. culmorum* dans ce présent travail, vient confirmer les résultats obtenus dans l'étude précédente. L'utilisation de la réaction d'acétylation avec le [1'-¹⁴C]anhydride acétique s'est avérée d'une grande utilité, tout comme la disponibilité du 2 α -hydroxytrichodiène et du 2 α -acétoxytrichodiène synthétiques, pour isoler et purifier le 2 α -hydroxytrichodiène à cause de sa très faible accumulation dans le milieu de production.

Son existence possible a été suggérée par la découverte du 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol chez *F. culmorum* dans notre laboratoire (Zamir *et al.*, 1991a) et par Hesketh *et al.* (1993) en se basant sur leurs travaux où un système acellulaire de *F. culmorum* n'a pas été en mesure de catalyser l'époxydation du trichodiène. C'est la première fois que cet intermédiaire est isolé comme métabolite naturel. De plus, il a été isolé directement à partir du milieu de culture contrairement à la majorité des intermédiaires oxygénés bicycliques qui ont été isolés à partir de souches mutantes, d'expériences d'alimentation avec du trichodiène radiomarqué, puis d'expériences d'alimentation avec du mévalonate radiomarqué et l'utilisation d'inhibiteurs de monooxygénase.

2.0 Le 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol: deuxième intermédiaire oxygéné post-trichodiène

Une première étude réalisée dans notre laboratoire (Zamir *et al.*, 1991a) a résulté en l'isolement du 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol à partir de cultures de *F. culmorum* alimentées avec du [2-¹⁴C]mévalonate et traitées avec l'inhibiteur de monooxygénase ancymidol. Dernièrement, une autre étude plus rigoureuse a prouvé que c'est un

intermédiaire des trichothécènes (Zamir *et al.*, 1999a). L'isolement du 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol en tant que métabolite naturel à partir d'un extrait du milieu de production de *F. culmorum* dans le présent travail, vient confirmer les études précédentes. C'est aussi la première fois, comme le 2 α -hydroxytrichodiène, que cet intermédiaire est isolé directement à partir du milieu de culture comme métabolite naturel. Malgré sa très faible accumulation dans le milieu de culture une quantité suffisante obtenue à partir de 5 litres de ce milieu a permis de caractériser ce composé par RMN. Le spectre obtenu était similaire à celui publié précédemment (Zamir *et al.*, 1991a).

Maintenant que le 2 α -hydroxytrichodiène et le 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol ont été isolés comme métabolites naturels chez *F. culmorum* (ce travail) et qu'ils ont été démontrés comme précurseurs des trichothécènes (Zamir *et al.*, 1999b), la prochaine étape sera d'isoler et de purifier l'enzyme responsable de l'époxydation du 2 α -hydroxytrichodiène. Cette dernière est très importante au point de vue toxicologie car la formation de la fonction époxyde en position C-12 et C-13 est essentielle à la toxicité des trichothécènes (Ehrlich et Daigle, 1987). Gledhill *et al.* (1991) ont réussi à catalyser cette réaction d'époxydation avec un système acellulaire, ils ont par contre employé un analogue non-naturel du trichodiène, soit le 9 β ,10 β -époxytrichodiène.

3.0 Oxygénation du trichodiène par un système acellulaire

3.1 Détermination d'une activité d'oxygénation du trichodiène par un extrait cellulaire de *F. culmorum*

Avec la découverte du 2 α -hydroxytrichodiène comme métabolite naturel (ce travail) et la preuve de son incorporation dans les trichothécènes (Zamir *et al.*, 1999a), l'étape suivante était de déterminer l'activité enzymatique responsable de sa formation chez *F. culmorum*. À partir d'un extrait cellulaire de cette moisissure, une activité de monooxygénation du trichodiène menant au 2 α -hydroxytrichodiène a été détectée grâce à un test enzymatique dont les conditions étaient similaires à celles employées pour ce genre de réaction catalysée par les cytochromes P450 monooxygénases dont l'hydroxylation de l'isotrichodermine chez *F. culmorum* (Zamir *et al.*, 1996; Abi Farah, 1998). La mesure de l'activité enzymatique, méthode très sensible et très spécifique, a permis de détecter la formation d'un produit radioactif qui co-éluait au HPLC avec le 2 α -hydroxytrichodiène synthétisé qui servait de standard interne. Pour obtenir la formation de ce produit, l'essai enzymatique a nécessité la présence de l'extrait cellulaire actif, c'est-à-dire lorsqu'il n'était pas inactivé par la chaleur. Ainsi, ces résultats démontrent que l'extrait cellulaire obtenu de *F. culmorum* catalyse l'hydroxylation en position C-2 du trichodiène formant ainsi le premier intermédiaire oxygéné dans la biosynthèse des trichothécènes, le 2 α -hydroxytrichodiène.

Une expérience similaire a été réalisée par Gledhill *et al.* (1991) avec un extrait cellulaire de *F. culmorum*, mais centrifugé à 2500 x g afin d'être employé comme système acellulaire. Les auteurs ont utilisé le [¹⁴C]trichodiène comme substrat et ils ont conclu que leur système n'était pas en mesure de le transformer. Or, cette affirmation se basait sur la formation de la fonction époxyde en position C-12 et C-13 ou l'hydroxylation en position C-11 et comme il est maintenant reconnu, le premier intermédiaire post-trichodiène n'est pas le 12,13-époxytrichodiène ou le 11 α -hydroxytrichodiène, mais plutôt le 2 α -hydroxytrichodiène. Malgré des conditions de réactions très similaires à celles que nous

avons employées, les auteurs n'ont pu détecter la formation du 2 α -hydroxytrichodiène car ils n'avaient pas de standard synthétique du produit cherché.

3.2 Localisation intracellulaire de l'activité d'oxygénation du trichodiène

Après avoir effectué une série de centrifugations différentielles pour l'obtention des fractions solubles et microsomaux, les résultats ont démontré que l'activité d'oxygénation du trichodiène se retrouvait dans les microsomes. Ce résultat est en accord avec le fait que l'activité de monooxygénation (hydroxylation), généralement catalysée par les cytochromes P450 monooxygénases, se retrouve principalement dans les microsomes chez les eucaryotes et plus spécifiquement chez les champignons (Van Den Brink *et al.*, 1998).

En effet, de nombreux exemples sont décrits dans la littérature, dont l'hydroxylation en position C-15 de l'isotrichodermine (localisée dans les microsomes) impliquée dans la biosynthèse des trichothécènes chez *F. culmorum* (Zamir *et al.*, 1996; Abi Farah, 1998), l'hydroxylation subterminale (ω -1, ω -2, et ω -3) des acides gras chez *F. oxysporum* (Nakayama et Shoun, 1994), l'hydroxylation en position C-11 de la progestérone chez *Rhizopus nigricans* (Makovec et Breskvar, 1998), l'hydroxylation en position C-4 du benzoate chez *Rhodotorula minuta* (Fukuda *et al.*, 1996), et l'hydroxylation en position C-15 du 13-éthyl-gon-4-ène-3,17-dione chez *Penicillium raistrickii* (Irrgang *et al.*, 1997). Une tentative d'oxygénation du trichodiène par les microsomes de *F. sporotrichioides* a été rapportée (Desjardins *et al.*, 1988), mais sans succès. Les auteurs n'ont cependant donné aucun détail sur l'approche expérimentale utilisée pour cette expérience ne nous permettant pas ainsi de comparer avec la nôtre.

L'activité d'oxygénation du trichodiène (ce travail) et de l'isotrichodermine (Zamir *et al.*, 1996; Abi Farah, 1998) dans les microsomes semblent démontrer que le siège des oxygénations, impliquées dans la biosynthèse des trichothécènes, est le réticulum endoplasmique où des monooxygénases liées à la membrane de ce dernier

catalysent ces réactions. Par ailleurs, dans la biosynthèse de l'aflatoxine B1 chez *Aspergillus parasiticus*, les oxygénations menant à cette mycotoxine ont aussi lieu dans le réticulum endoplasmique (Woloshuk et Priet, 1998; Yabe *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1997). Ainsi, l'utilisation des microsomes de *F. culmorum* pour leur capacité à oxygéner les autres précurseurs du 3-ADN et SOL permettra mieux de conclure sur le site intracellulaire des oxygénations.

3.3 Caractérisation de l'enzyme catalysant l'hydroxylation en position C-2 du trichodiène chez *Fusarium culmorum*

L'activité d'oxygénation détectée dans les microsomes, suggère l'implication d'une cytochrome P450 monooxygénase. La nécessité des cofacteurs NADPH, FAD, et FMN vient supporter cette hypothèse car ceux-ci sont reconnus pour être essentiels à l'activité d'oxygénation de la majorité des cytochromes P450 monooxygénases retrouvés dans les microsomes (Porter, 1991; Kurzban et Strobel, 1986; Vermillion *et al.*, 1981). Ils permettent le transport des électrons du NADPH au FAD au FMN et finalement à l'accepteur d'électrons cytochrome P450. Ainsi, la trichodiène oxygénase semble appartenir à la classe II des cytochromes P450 monooxygénases qui se définissent comme celles nécessitant FAD/FMN pour le transfert d'électrons du NADPH au noyau hème et se retrouvant dans les microsomes (Peterson *et al.*, 1997).

La solubilisation des microsomes est essentielle avant de passer à la chromatographie pour la purification. Cette étape est critique car le choix et la concentration du détergent utilisé doit permettre de récupérer l'activité et de l'augmenter si possible. Les détergents non-ioniques, tel que le Brij 35, sont reconnus pour substituer les lipides nécessaires au maintien de l'intégrité de la cytochrome P450 monooxygénase dans la membrane (Kaminsky *et al.*, 1987). Le Brij 35 a aussi été choisi car il a été trouvé étant le meilleur détergent pour l'incorporation du trichodiène dans les trichothécènes (Zamir *et al.*, 1989). Auparavant, les phospholipides étaient employés pour solubiliser cette enzyme et permettaient ainsi de faciliter la formation d'un complexe cytochrome

P450/NADPH-cytochrome P450 réductase actif mais ils ont été remplacés par les détergents non-ioniques avec succès (Dean et Gray, 1982; Lu *et al.*, 1974; Wagner *et al.*, 1984). Il a aussi été observé que ces détergents augmentaient l'activité à faible concentration mais inhibaient fortement l'activité à haute concentration. Ainsi, avec une concentration finale de 0,17% de Brij 35, nous avons augmenté l'activité spécifique d'un facteur 2,1 tout en récupérant la presque totalité de l'activité enzymatique.

La détection d'une bande dans le gel natif de polyacrylamide 8% coloré à la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine / H₂O₂ indique la présence d'une hémoprotéine dans les microsomes qui peut être une cytochrome P450 monooxygénase. Il est surprenant d'avoir détecté seulement une bande dans les microsomes avec ce test qui se veut très sensible. Avec sept oxygénations dans la biosynthèse des trichothécènes, autant de monooxygénases peuvent exister, à moins qu'elles possèdent toutes le même poids moléculaire, qu'elles ne soient pas exprimées en même temps durant la biosynthèse de ces mycotoxines, qu'elles soient de nature différente, qu'une monooxygénase puissent catalyser différentes oxygénations, qu'elles ne soient pas localisées dans les microsomes, ou pour d'autres raisons inconnues. Or, en tenant compte du fait que les microsomes possèdent une activité d'oxygénation face au trichodiène et qu'une bande soit présente dans ceux-ci, il est possible que la trichodiène oxygénase soit une cytochrome P450 monooxygénase constituée de deux domaines, soit cytochrome P450 et NADPH-cytochrome P450 réductase. Ainsi, la cytochrome P450 monooxygénase isolé chez *Bacillus megaterium* composée d'un domaine NADPH-cytochrome P450 réductase et d'un domaine cytochrome P450 (Owers Narhi et Fulco, 1986) possèdent un poids moléculaire de 119 kDa, tout comme celle isolé chez *Fusarium oxysporum* avec un poids moléculaire de 118 kDa (Nakayama *et al.*, 1996). Ces poids moléculaires sont la somme approximative d'un cytochrome P450 dont la valeur varie de 46 à 58 kDa et d'une NADPH-cytochrome P450 réductase dont la valeur est environ 78 kDa (Ortiz de Montellano, 1986).

Les tentatives de purification de cette enzyme avec la colonne d'affinité 2',5'-ADP Sépharose 4B semblent confirmer cette hypothèse. Aucune activité n'a été retrouvée dans le volume mort et le retentat, et cette perte d'activité n'est pas due à la stabilité de l'enzyme car après une période d'entreposage de 9,5 heures à 4-6°C elle est encore active avec 67% de l'activité initiale. Ceci laisse supposer que la NADPH-cytochrome P450 réductase aurait accroché à la colonne et le cytochrome P450 se serait détachée de celle-ci. La cytochrome P450 monooxygénase, nommée cytochrome P450foxy, isolée chez *F. oxysporum* a été réalisée grâce à cette colonne d'affinité puisque les deux domaines de cette protéine sont fusionnés (Nakayama et Shoun, 1994; Nakayama *et al.*, 1996). Hors, la presque totalité des cytochromes P450 monooxygénases sont composés des deux domaines non-fusionnés chez les eucaryotes (Van den Brink *et al.*, 1998) et plusieurs exemples dans la littérature rapportent plutôt la purification du domaine NADPH-cytochrome P450 réductase avec la colonne 2',5'-ADP Sépharose 4B. Par exemple, celle des microsomes de *Rhizopus nigricans* (Makovec et Breskvar, 1998), des microsomes du cerveau de rat (Anandatheerthavarada *et al.*, 1992), des microsomes du foie de rat et cochon (Yasukochi et Masters, 1976), et celle du placenta humain (Muto et Tan, 1986).

La purification des cytochromes P450 monooxygénases a souvent été difficile voir même impossible dû à leur faible expression et leur instabilité. C'est pour cette raison que dans les cas mentionnés ci-haut, un système de reconstitution de l'activité de monooxygénation a été réalisé avec un cytochrome P450 provenant de différentes sources ajoutées à la NADPH-cytochrome P450 réductase purifiée et les cofacteurs nécessaires. Afin de confirmer l'hypothèse des deux domaines de la trichodiène oxygénase, l'utilisation d'un tel système serait nécessaire étant donné qu'aucune activité n'a été détectée en combinant les fractions volume mort et retentat.

De nos jours, les techniques de la biologie moléculaire sont de plus en plus utilisées pour isoler les gènes exprimant les cytochromes P450 monooxygénases due à la difficulté de purifier ces enzymes par les techniques biochimiques habituelles. Ainsi, le gène *TRI4* a été isolé à partir de *Fusarium sporotrichioides* et un alignement de séquences

a permis de le classer comme cytochrome P450 monooxygénase (Hohn *et al.*, 1995). L'inactivation de ce gène a résulté en l'accumulation du trichodiène et les auteurs ont conclu qu'il pourrait être responsable de la première oxygénation dans la biosynthèse des trichothécènes. Cependant, ils n'ont pu déterminer le premier métabolite post-trichodiène oxygéné. Les auteurs affirment qu'ils n'ont pas été en mesure d'identifier cet intermédiaire car il ne s'est pas accumulé dans leur milieu de culture liquide et solide et que l'utilisation de différentes techniques d'alimentation avec des précurseurs radiomarqués a été sans succès.

Conclusion

L'objectif majeur de cette étude était d'isoler le 2 α -hydroxytrichodiène comme métabolite naturel chez *Fusarium culmorum* et d'isoler la monooxygénase catalysant la première oxygénation du trichodiène menant à cet intermédiaire. Ceci dans le but ultime de contrôler ou de prévenir, en inhibant cette réaction enzymatique, la production biologique de ces mycotoxines qui contaminent les récoltes céréalières et nuisent ainsi à la santé des humains et des animaux.

À partir d'un extrait de 5L du milieu de production de *F. culmorum*, le 2 α -hydroxytrichodiène a été isolé et purifié pour la première fois comme métabolite naturel. Ceci s'est fait par la technique d'acétylation avec [1'-¹⁴C]anhydride acétique et l'utilisation de ce composé synthétisé dans notre laboratoire. Cette technique s'est avérée essentielle à cause de la très faible accumulation de cet intermédiaire dans le milieu de production. De plus, l'intermédiaire soupçonné d'être après le 2 α -hydroxytrichodiène dans la biosynthèse a été isolé, purifié et caractérisé dans ce même extrait, soit le 12,13-époxy-9,10-trichoène-2-ol.

Un test enzymatique, dépendant en NADPH et non en NADH, a démontré que l'oxygénation du trichodiène menant au 2 α -hydroxytrichodiène était retrouvée dans les microsomes. De plus, l'activité augmentait de 102% en présence de FMN 10 μ M / FAD 10 μ M dans les microsomes. Par la suite, la solubilisation des microsomes avec une concentration finale de 0,17% du détergent Brij 35 a permis de doubler cette activité.

Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec une coloration au 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine / H₂O₂ a révélé la présence d'une bande bleue dans les microsomes. Cette hémoprotéine peut être une cytochrome P450 monooxygénase généralement composé d'un domaine cytochrome P450 et d'un domaine NADPH-cytochrome P450 réductase. De plus, plusieurs tentatives avec la colonne d'affinité 2',5'-ADP-Sépharose 4B n'ont pas permis de récupérer l'activité de l'enzyme, ce qui laisse supposer que la réductase s'est détachée du cytochrome P450. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'oxygénation du trichodiène serait catalysée par une cytochrome P450 monooxygénase

contenant un domaine FAD et FMN. Ces caractéristiques sont en accord avec la Classe II des cytochromes P450 monooxygénases qui se définissent comme celles nécessitant FAD / FMN pour le transfert d'électrons du NADPH au noyau hème, et elles se retrouvent dans les microsomes.

En somme, cette étude rapporte pour la première fois une activité enzymatique catalysant la première oxygénation du trichodiène dans la biosynthèse des trichothécènes. Le produit de cette réaction est le 2 α -hydroxytrichodiène dont l'isolement comme métabolite naturel est rapporté aussi pour la première fois. De plus, la nature de cette enzyme semble être une cytochrome P450 monooxygénase.

La prochaine étape sera de purifier cette enzyme avec les techniques habituelles de purification des protéines afin de déterminer avec certitude sa nature. Avec les difficultés envisagées par l'utilisation de ces méthodes et l'instabilité de cette enzyme, il serait peut être mieux d'isoler son gène en se servant d'une sonde conçue à partir du gène *TRI4* de *F. sporotrichioides* codant pour une cytochrome P450 monooxygénase qui semble responsable de la première oxygénation du trichodiène. Il sera nécessaire dans l'avenir d'isoler, de purifier et de cloner les autres monooxygénases afin de mieux comprendre leur mode de fonctionnement dans la biosynthèse des trichothécènes. Incidemment, les monooxygénases impliquées dans le début de la biosynthèse permettront la conception d'inhibiteurs spécifiques de celles-ci afin de bloquer la production biologique de ces mycotoxines. Idéalement, ces inhibiteurs spécifiques auraient une structure analogue au trichodiène avec une toxicité inexistante car il est connu que les trichothécènes au stade bicyclique ne sont pas toxiques. Cette approche ouvrirait ainsi la voie au développement de traitements pour la contamination des récoltes agricoles par les moisissures *Fusarium*.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche Lolita Zamir de m'avoir accepté dans son laboratoire et d'avoir cru en mes compétences dès le début. Merci à Salvatore Sparace du Département de phytotechnie de l'Université McGill pour ses conseils lors de l'isolement de la monooxygénase. Merci à Françoise Sauriol du Département de chimie de l'Université McGill pour les analyses par RMN. Merci à l'agent de recherche Anastasia Nikolakakis pour son expertise dans le laboratoire. Merci à Marie-Claude Rousseau pour la synthèse du substrat. Merci à Carole Abi Farah pour les nombreuses discussions scientifiques concernant nos projets de recherche. Je voudrais également remercier ceux et celles qui ont séjourné(e)s dans notre laboratoire; Kristina, Sarahla, Hanling, Isabelle, Alice, Katia, Gaétan, René, Frédéric, Yi Feng, Junzheng, et Jian Hui. Merci aussi à Yann d'avoir fourni les logiciels qui m'ont permis de mettre sur papier ce travail.

Mes salutations à l'Association des Joueurs de la Ligue de Hockey Bottine de l'IAF pour les deux saisons pleines de rebondissements, tout comme aux membres du club de volleyball sur gazon pour les midis ensoleillés. Merci à Marco et Martin pour les parties de tennis "chaudement" disputées.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à mes parents Micheline et Alain pour leur support durant cette rocambolesque aventure. Merci aussi à ma "petite" sœur Marilyne et ma grand-mère adorée Clémence pour leur présence et leurs encouragements.

À Karina, la femme de ma vie, je te remercie pour ta présence indispensable, ton amour inconditionnel, tes nombreux encouragements et ton support titanesque.

Bibliographie

- Abi Farah, C. 1998. Purification partielle et étude de l'enzyme catalysant la conversion de l'isotrichodermine en 15-déacétylcalonecitrine chez *Fusarium culmorum*. Mémoire de maîtrise. Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval. 76 pages.
- Achilladelis, B. A., Adams, P. M., Hanson, J. R. 1970. The biosynthesis of the sesquiterpenoid trichothecane antibiotics. *Chem. Commun.* **8**:511.
- Achilladelis, B. A., Adams, P. M., Hanson, J. R. 1972. Studies in terpenoid biosynthesis. Part 8. The formation of the trichothecane nucleus. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **11**:1425-1428.
- Adams, P. M., Hanson, J. R. 1970. Biosynthesis of the sesquiterpenoid trichothecane antibiotics. *Chem. Commun.* **22**:1569-1570.
- Adams, P. M., Hanson, J. R. 1971. A hydrogen shift in trichothecane biosynthesis. *Chem. Commun.* **23**:1414-1415.
- Alexander, N. J., Hohn, T. M., McCormick, S. P. 1998. The *TR111* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a Cytochrome P-450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:221-225.
- Anandatheerthavarada, H. K., Boyd, M. R., Ravindranath, V. 1992. Characterization of a phenobarbital-inducible cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 reductase and reconstituted cytochrome P-450 mono-oxygenase system from rat brain. Evidence for constitutive presence in rat and human brain. *Biochem. J.* **288**:483-488.
- Arigoni, D., Cane, D. E., Müller, B., Tamm, C. 1973. The mode of incorporation of farnesyl pyrophosphate into verrucarol. *Helv. Chim. Acta* **56**:2946-2949.
- Ashton, P. S., Meselson, M., Perry Robinson, J. P., Seeley, T. D. 1983. Origin of yellow rain. *Science* **222**:366-368.
- Baldwin, N. C. P., Bycroft, B. W., Dewick, P. M., Gilbert, J., Holden, I. 1985. Biosynthesis of trichothecene mycotoxins in *Fusarium culmorum* cultures. *Z. Naturforsch. [C]* **40**:514-518.
- Bateman, G. L., Kwasna, H., Ward, E. 1996. Relationships among *Fusarium* spp. estimated by comparing restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction-amplified nuclear rDNA. *Can. J. Microbiol.* **42**: 1232-1240.
- Beremand, M. N. 1987. Isolation and characterization of mutants blocked in T-2 toxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1855-1859.
- Beremand, M. N., Black, P. J., Plattner, R. D. 1988. Isolation and characterization of two new mutants blocked in T-2 toxin biosynthesis. *J. Cell Biochem. Suppl.* **12c**:261.

- Boldt, E. 1989. *Baccharis* (Asteraceae), a review of its taxonomy, phytochemistry, ecology, economic status, natural enemies and potential for its biological control in the United States. USDA-ARS Grassland, Soil and Water Research Laboratory, Texas. Publication MP1674.
- Bruns, T. D., White, T. J., Taylor, J. W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **22**:525-564.
- Bu'Lock, J. D. 1965. The biosynthesis of natural products. McGraw Hill, New York.
- Cane, D. E., Ha, H., Pargellis, C., Waldmeier, F., Swanson, S., Murthy, P. P. N. 1985. Trichodiene biosynthesis and the stereochemistry of the enzymatic cyclization of farnesyl pyrophosphate. *Bioorg. Chem.* **13**:246-265.
- Cane, D. E., Ha, H. 1988. Trichodiene biosynthesis and the role of nerolidyl pyrophosphate in the enzymatic cyclization of farnesyl pyrophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **110**:6865-6870.
- Cane, D. E., Pawlak, J. L., Horak, R. M., Hohn, T. M. 1990. Studies of the cryptic allylic pyrophosphate isomerase activity of trichodiene synthase using the anomalous substrate 6,7-dihydrofarnesyl pyrophosphate. *Biochemistry* **29**:5476-5490.
- Cane, D. E., Yang, G., Coates, R. M., Pyun, H., Hohn, T. M. 1992. Trichodiene synthase. Synergistic inhibition by inorganic pyrophosphate and aza analogs of the bisabolyl cation. *J. Org. Chem.* **57**:3454-3462.
- Cane, D. E., Wu, Z., Oliver, J. S., Hohn, T. M. 1993. Overproduction of soluble trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**:416-422.
- Cane, D. E., Yang, G. 1994. Trichodiene synthase. Stereochemical studies of the cryptic allylic diphosphate isomerase activity using an anomalous substrate. *J. Org. Chem.* **59**:5794-5798.
- Casteel, S. W., Braun, W. F. 1992. Mycotoxins. Encyclopedia of Microbiology, Vol. 3, Academic Press, New York, 217-227.
- Corley, D. G., Rottinghaus, G. E., Tempesta, M. S. 1987. Toxic trichothecenes from *Fusarium sporotrichioides* (MC-72083). *J. Org. Chem.* **52**:4405-4408.
- Cutler, H. 1988. Trichothecenes and their role in the expression of plant disease. Biotechnology of crop protection. *ACS Symp. Ser.* **379**:50-72.
- D'Amico, G. D. 1987. The commonest glomerulonephritis in the world: IgA nephropathy. *Q. J. Med.* **247**:709-727.

- Davis, B. J. 1964. Disc Electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**:404-427.
- Dean, W. L., Gray, R. D. 1982. Relationship between state of aggregation and catalytic activity for cytochrome P-450LM2 and NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* **257**:14679-14685.
- Desjardins, A. E., Plattner, R. D., WanMiddlesworth, F. 1986. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*: origin of the oxygen atoms of T-2 toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:493-497.
- Desjardins, A. E., Plattner, R. D., Beremand, M. N. 1987. Ancymidol blocks trichothecene biosynthesis and leads to accumulation of trichodiene in *Fusarium sporotrichioides* and *Gibberella pulicaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1860-1865.
- Desjardins, A. E., Plattner, R. D., Spencer, G. F. 1988. Inhibition of trichothecene toxin biosynthesis by naturally occurring shikimate aromatics. *Phytochemistry* **27**:767-771.
- Dockfrill, B., Hanson, J. R., sieverns, M. 1978. The biosynthesis of trichothecin from acetate-(1,2-¹³C₂). *Phytochemistry* **17**:427-430.
- Eddington, P. G. 1997. Gassed in the Gulf: the inside story of the Pentagon-CIA cover-up of Gulf War syndrome. Insignia Publishing Company, Washington, 262-264.
- Ehrlich, K. C., Daigle, K. W. 1987. Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes. *Biochem. Biophys. Acta* **923**:206-213.
- Evans, R., Hanson, J. R. 1976. Studies in terpenoid biosynthesis. Part XIV. Formation of the sesquiterpene trichodiene. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **3**:326-329.
- Fekete, C., Giczey, G., Papp, I., Taborhegyi, E., Szabo, L., Hornok, L. 1995. High frequency occurrence of virus-like particles with double-stranded RNA genome in nontoxic strains of *Fusarium poae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**:295-299.
- Feinberg, B., McLaughlin, C. S. 1989. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. Dans: Trichothecene mycotoxicosis: pathophysiologic Effects. Vol. 1, Beasley, V. R. (ed), CRC Press, Boca Raton, FL, p.27.
- Fishman, J., Jones, E. R. H., Lowe, G., Whiting, M. C. 1959. The structure and biogenesis of trichothecin. *Proc. Chem. Soc.* 127-128.
- Freeman, G. G., Morrison, R. I. 1948. Trichothecin: an antifungal metabolic product of *T. roseum* link. *Nature* **162**:30.

- Fukuda, H., Nakamura, K., Sukita, E., Ogawa, T., Fujii, T. 1996. Cytochrome P450_{rm} from *Rhodotorula minuta* catalyzes 4-hydroxylation of benzoate. *J. Biochem. (Tokyo)* **119**:314-318.
- Gledhill, L., Hesketh, A. R., Bycroft, B. W., Dewick, P. M., Gilbert, J. 1991. Biosynthesis of trichothecene mycotoxins: cell-free epoxydation of a trichodiene derivative. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**:241-246.
- Greenhalgh, R., Hanson, A. W., Miller, J. D., Taylor, A. 1984. Production and X-ray crystal structure of 3 α -acetoxy-7 α -15-diol-12,13-epoxytrichothec-9-en-8one. *J. Agric. Food Chem.* **32**:945-948.
- Greenhalgh, R., Levandier, D., Adams, W., Miller, J. D., Blackwell, B. A., McAlees, A. J., Taylor, A. 1986. Production and characterization of deoxynivalenol and other secondary metabolites of *Fusarium culmorum* (CMI 14764; HLX 1503). *J. Agric. Food Chem.* **34**:98-102.
- Guadet, J., Julien, J., Lafay, J. F., Brygoo, Y. 1989. Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.* **6**:227-242.
- Hanson, J. R., Marten, T., Siverns, M. 1974. Studies in terpenoid biosynthesis. Part XII. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of the trichothecanes and the biosynthesis of trichothecolone from [2-¹³C] mevalonic acid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1033-1036.
- Hedman, R., Pettersson, H. 1997. Transformation of nivalenol by gastrointestinal microbes. *Arch. Tierernahr* **50**:321-329.
- Hernandez, F., Cannon, M. 1982. Inhibition of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by the 12,13-epoxytrichothecenes trichodermol, diacetoxyscirpenol and verrucarin A. *J. Antibiotics* **35**: 875-881.
- Hesketh, A. R., Gledhill, L., Marsh, D. C., Bycroft, B. W., Dewick, P. M., Gilbert, J. 1990. Isotrichodiol: A post-trichodiene intermediate in the biosynthesis of trichothecene mycotoxins. *J. Chem. Soc., Chem Commun.* 1184-1186.
- Hesketh, A. R., Gledhill, L., Marsh, D. C., Bycroft, B. W., Dewick, P. M., Gilbert, J. 1991. Biosynthesis of trichothecene mycotoxins: Identification of isotrichodiol as a post-trichodiene intermediate. *Phytochemistry* **30**:2237-2243.
- Hesketh, A. R., Gledhill, L., Bycroft, B. W., Dewick, P. M., Gilbert, J. 1993. Potential inhibitors of trichothecene biosynthesis in *Fusarium culmorum*: epoxidation of a trichodiene derivative. *Phytochemistry* **32**:93-104.

- Hobden, A. N., Cundliffe, E. 1980. Ribosomal resistance to the 12,13-epoxytrichothecene antibiotics in the producing organism *Myrothecium verrucaria*. *Biochem. J.* **190**:765-770.
- Hohn, T. M., VanMiddlesworth, F. 1986. Purification of the sesquiterpene cyclase trichodiene synthetase from *Fusarium sporotrichioides*. *Arch. Biochem. Biophys.* **251**:756-761.
- Hohn, T. M., Beremand, P. D. 1989. Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene* **79**:131-138.
- Hohn, T. M., Desjardins, A. E. 1992. Isolation and gene disruption of the *Tox5* gene encoding trichodiene synthase in *Gibberella pulicaris*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **5**:249-256.
- Hohn, T. M., Desjardins, A. E., McCormick, S. P. 1995. The *Tri4* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **248**:95-102.
- Hsia, C. C., Wu, J. L., Lu, X. Q., Li, Y. S. 1988. Natural occurrence and clastogenic effects of nivalenol, deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, and zearalenone in corn from a risk area of esophageal cancer. *Cancer Detect. Prev.* **13**:79-86.
- Hughes, B. J., Hsieh, G. C., Jarvis, B. B., Sharma, R. P. 1989. Effects of macrocyclic trichothecene mycotoxins on the murine immune system. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **18**:388-395.
- Iglesias, M., Ballesta, J. P.G. 1994. Mechanism of resistance to the antibiotic trichothecin in the producing fungi. *Eur. J. Biochem.* **223**:447-453.
- Irrgang, S., Schlosser, D., Fritsche, W. 1997. Involvement of cytochrome P-450 in the 15 α -hydroxylation of 13-ethyl-gon-4-ene-3,17-dione by *Penicillium raistrickii*. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **60**:339-346.
- Islam, Z., Nagase, M., Yoshizawa, T., Yamauchi, K., Sakato, N. 1998. T-2 toxin induces thymic apoptosis *in vivo* in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **148**:205-214.
- Jarvis, B. B., Midowo, J. O., Tuthill, M. B., Bean, G. A. 1981. Interaction between the antibiotic trichothecenes and the higher plant *Baccharis megapotamica*. *Science* **214** :4600-462.
- Jarvis, B. B., Acierto, A. M. 1989. Anticancer properties of trichothecenes. Dans: Trichothecene mycotoxicosis : Pathophysiologic effects. Vol. 1, Beasley, V. R. (ed), CRC Press, Boca Raton, FL, pp.73-105.

- Jarvis, B. B. 1991. Macrocyclic trichothecenes. Dans: Sharma, R. P., Salunkhe, D. K. (ed) *Mycotoxins and phytoalexins*. CRC Press, Boca Raton, pp. 361-421.
- Jarvis, B. B., Mokhtari-Rejali, N., Schenkel, E., Barros, C. S., Matzenbacher, N. I. 1991. Trichothecene mycotoxins from Brazilian *Baccharis* species. *Phytochemistry* **30**:789-797.
- Jones, E. R. H., Lowe, G. 1960. The biogenesis of trichothecin. *J. Chem. Soc.* 3959-3962.
- Kaminsky, L. S., Dunbar, D., Guengerich, F. P., Lee, J. J. 1987. Detergents as probes of reconstituted rat liver cytochrome P-450 function. *Biochemistry* **26**:1276-1283.
- Kuiper-Goodman, T. 1985. Potential human health hazards and regulatory aspects. Dans: *Mycotoxins, a Canadian perspective*. Scott, P. M., Trenholm, H. L., Sutton, M. D., (ed), NRCC no. 22848, National Research Council, Ottawa, pp. 103-111.
- Kurzban, G. P., Strobel, H. W. 1986. Preparation and characterization of FAD dependent NADPH cytochrome P450 reductase. *J. Biol. Chem.* **261**:7824-7830.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- Lake, B. G., Philips, J. C., Walters, D. G., Bayley, D. L., Cook, M. W., Thomas, L. V. Gilbert, J., Startin, J. R., Baldwin, N. C. P., Bycroft, B. W., Dewick, P. M. 1987. Studies on the metabolism of deoxynivalenol in the rat. *Fd Chem. Toxic.* **25**:589-592.
- Lu, A. Y. H., Levin, W. 1974. The resolution and reconstitution of the liver microsomal hydroxylation system. *Biochim. Biophys. Acta* **344**:205-240.
- Luo, Y., Yoshizawa, T., Katayama, T. 1990. Comparative study of the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3723-3726.
- Machida, Y., Nozoe, S. 1972a. Biosynthesis of trichothecin and related compounds. *Tetrahedron Lett.* 1969-1972.
- Machida, Y., Nozoe, S. 1972b. Biosynthesis of trichothecin and related compounds. *Tetrahedron* **28**:5113-5117.
- Maddox, J. 1984. Natural history of yellow rain. *Nature* **309**:207.
- Manicom, B. Q., Bar-Joseph, M., Kotzé, J. M. 1990. Molecular methods of potential use in the identification and taxonomy of filamentous fungi. *Phytophylactica* **22**:233-239.

- Marasas, W. O., Nelson, P. E., Toussoun, T. A. 1984. Toxigenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology. Pennsylvania State University Press, University Park, 46-50.
- Makovec, T., Breskvar, K. 1998. Purification and characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase from filamentous fungus *Rhizopus nigricans*. *Arch. Biochem. Biophys.* **357**:310-316.
- McCormick, S. P., Taylor, S. L., Plattner, R. D., Beremand, M. N. 1989. New modified trichothecenes accumulated in solid culture by mutant stains of *Fusarium sporotrichioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2195-2199.
- McCormick, S. P., Taylor, S. L., Plattner, R. D., Beremand, M. N. 1990. Bioconversion of possible T-2 toxin precursors by a mutant strain of *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3299. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:702-706.
- Miller, J. D., Taylor, A., Grennhalg, R. 1983. Production of deoxynivalénol and related compounds in liquid culture by *Fusarium graminearum*. *Can. J. Microbiol.* **29**:1171-1178.
- Mirocha, C. J., Pawlosky, R. A., Chatterjee, K., Watson, S., Hayes, W. 1983. Analysis for *Fusarium* toxins in various samples implicated in biological warfare in Southeast Asia. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66**:1485-1499.
- Miura, K., Nakajima, Y., Yamanaka, N., Terao, K., Shibato, T., Ishino, S. 1998. Induction of apoptosis with fusarenon-X in mouse thymocytes. *Toxicology* **127**:195-206.
- Mohr, P., Tamm, C., Zurcher, W., Zehuder, M. 1984. Sambucinol and sambucoin, two new metabolites of *Fusarium sambucinum* possessing modified trichothecene structures. *Helv. Chim. Acta* **67**:406-412.
- Mulè, G., Logrieco, A., Stea, G., Bottalico, A. 1997. Clustering of trichothecene-producing *Fusarium* strains determined from 28S ribosomal DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1843-1846.
- Muto, N., Tan, L. 1986. Purification and properties of human placental NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biochem. Cell. Biol.* **64**:184-193.
- Nakayama, N., Shoun, H. 1994. Fatty acid hydroxylase of the fungus *Fusarium oxysporum* is possibly a fused protein of cytochrome P-450 and its reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**:586-590.
- Nakayama, N., Takemae, A., Shoun, H. 1996. Cytochrome P450foxy, a catalytically self-sufficient fatty acid hydroxylase of the fungus *Fusarium oxysporum*. *J. Biochem.* **119**:435-440.

- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., Nebert, D. W. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**:1-42.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park.
- Nishie, K., Cutler, H. G., Cole, R. J. 1989. Toxicity of trichothecenes, moniliformin, zearalenone/ol, griseofulvin, patulin, PR toxin and rubratoxin B on protozoan tetrahymena pyriformis. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **65**:197-210.
- Nozoe, S., Machida, Y. 1970. Isolation and structure of trichodiol, a new sesquiterpenoid from *Trichothecium roseum*. *Tetrahedron Lett.* **14**:1177-1179.
- Nozoe, S., Machida, Y. 1972. The structures of trichodiol and trichodiene. *Tetrahedron* **28**:5105-5111.
- O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. Dans: The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Reynolds, D. R., Taylor, J. W. (ed), CAB International, Wallingford, U. K., pp. 225-233.
- Ohta, Y., Andersen N. H., Liu, C. B. 1977. Sesquiterpene constituents of two liverworts of genus diplophyllum. *Tetrahedron* **33**:617-628.
- Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**:321-349.
- Ortiz de Montellano, P. R. 1986 Cytochrome P-450. Structure, mechanism, and biochemistry. Plenum Press. New York. 556 pages.
- Ouellet, T., Seifert, K., Miller, J. D., Seaman, L. W. 1998. Mise en évidence des *Fusarium* infectant le grain de blé et de maïs par des méthodes moléculaires [En ligne]. 3 pages. Adresse HTTP: <http://res.arg.ca/ecorc/program1/research/advances/resf-14.html>
- Owers Narhi, L., Fulco, A. J. 1986. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* **261**:7160-7169.
- Ozols, J. 1990. Preparation of membrane fractions. Dans: Methods in enzymology. Guide to protein purification. Vol. 182, Deutscher, M. P. (ed), Academic Press, San Diego, CA, pp. 225-235.
- Peterson, J. A., Sevrioukova, I., Truan, G., Graham-Lorence, S. E. 1997. P450BM-3: A tale of two domains-or is it three. *Steroids* **62**:117-123.

- Porter, T. D. 1991. An unusual yet strongly conserved flavoprotein reductase in bacteria and mammals. *Trends Biochem. Sci.* **16**:154-158.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., McCormick, S. P. 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**:593-601.
- Riisom, T., Jacobson, H. J., Rostrup-Anderson, N., Lorck, H. 1978. A ^{13}C NMR study on trichodermin. Spectral Assignments, spin-lattice relaxation, and biosynthetic incorporation of sodium ($1\text{-}^{13}\text{C}$)-acetate. *Acta Chem. Scand. B* **32**:499-504.
- Rio, B., Lautraite, S., Parent-Massin, D. 1997. *In vitro* toxicity of trichothecenes on human erythroblastic progenitors. *Hum. Exp. Toxicol.* **16**:673-679.
- Rizzo, I., Varsavky, E., Haidukowski, M., Frade, H. 1997. Macrocyclic trichothecenes in *Baccharis corodofolia* plants and endophytes and *Baccharis artemisioides* plants. *Toxicon* **35**:753-757.
- Rotter, B. A., Thompson, B. K., Clarkin, S., Owen, T. C. 1993. Rapid colorimetric bioassay for screening of *Fusarium* mycotoxins. *Natural Toxins* **1**:303-307.
- Rotter, B. A., Prelusky, D. B. 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health* **48**:1-34.
- Savard, M. E., Blackwell, B. A., Greenhalgh, R. 1989. The role of ^{13}C -labeled trichodiene and bazzanene in the secondary metabolism of *Fusarium culmorum*. *J. Nat. Prod.* **52**:1267-1278.
- Schwarz, P.B., Casper, H. H., Beattie, S. 1995. The fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53**:121-127.
- Scott, P. M. 1996. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *J. AOAC Int.* **79**:875-882.
- Seifert, K. 1996. FusKey, *Fusarium* Interactive Key [En ligne]. Adresse HTTP: <http://res.agr.ca/brd/fusarium/home1.html>
- Sharma, R. P., Kim, Y. W. 1991. Trichothecenes. Dans: Mycotoxins and phytoalexins. Sharma, R. P., Salunkhe, D. K. (ed), CRC Press, Boca Raton, 339-359.
- Spyker, M. S., Spyker, D. A. 1983. Yellow rain: chemical warfare in Southeast Asia and Afghanistan. *Vet. Hum. Toxicol.* **25**:335-340.

- Storrie, B., Madden, E. A. 1990. Isolation of subcellular organelles. Dans: *Methods in enzymology. Guide to protein purification*. Vol. 182, Deutscher, M. P. (ed), Academic Press, San Diego, CA, pp. 203-225.
- Sugawara, T., Tanaka, A., Nagai, K., Suzuki, K., Okada, G. 1997. New members of trichothecene family. *J. Antibiot (Tokyo)*. **50**:778-780.
- Tani, N., Dohi, Y., Onji, Y., Yonemasu, K. 1995. Antiviral activity of trichothecene mycotoxins (deoxynivalenol, fusarenon-X, and nivalenol) against herpes simplex virus types 1 and 2. *Microbiol. Immunol.* **39**:635-637.
- Thomas, P. E., Ryan, D., Levin, W. 1976. An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **75**:168-176.
- Thompson, W. L., Wannemacher, R. W. 1986. Structure-function relationships of 12,13-epoxytrichothecene mycotoxins in cell culture: comparison to whole animal lethality. *Toxicon* **24**:985-994.
- Trapp, S. C., Hohn, T. M., McCormick, S., Jarvis, B. B. 1998. Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecenes in *Myrothecium roridum*. *Mol. Gen. Genet.* **257**:421-432.
- Trucksess, M. W., Thomas, F., Young, K., Stack, M. E., Fulgueras, W. J., Page, S. W. 1995. Survey of deoxynivalenol in U.S. 1993 wheat and barley crops by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. AOAC Int.* **78**:631-636.
- Tucker, J. B. 1997. Mycotoxins and Gulf War Illness: A possible link [En ligne]. 16 pages. Adresse HTTP: <http://www.insigniausa.com/tucker.html>
- Ueno, Y. 1980. Trichothecene mycotoxins : mycology, chemistry, toxicology. *Adv. Nutr. Sci.* **3** :301-353
- Ueno, Y. 1983. Historical background of trichothecene problems. Dans: *Developments in food sciences. Trichothecenes. Chemical, biological and toxicological aspects*. Ueno Y (ed), Elsevier, Tokyo, 1-6.
- U.S. Army. 1996. *Medical Management of Biological Casualties. Handbook*. U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Fort Detrick, Frederick, Maryland [En ligne]. Adresse HTTP: <http://www.nbc-med.org/Fms/medman/cover.html>
- Van Den Brink, H. J. M., Van Gorcom, R. F. M., Van Den Hondel, C. A. M. J. J., Punt, P. J. 1998. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **23**:1-17.

- VanMiddlesworth, F., Desjardins, A. E., Taylor, S. L., Plattner, R. D. 1986. Trichodiene accumulation by ancymidol treatment of *Gibberella pulicaris*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1156-1157.
- Vermillion, J. L., Ballou, D. P., Massey, V., Coon, M. J. 1981. Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase. *J. Biol. Chem.* **256**:266-277.
- Visconti, A., Minervini, F., Lucivero, G., Gambatesa, V. 1991. Cytotoxic and immunotoxic effects of *Fusarium* mycotoxins using a rapid colorimetric bioassay. *Mycopathologia* **113**:181-186.
- Wagner, S. L., Dean, W. L., Gray, R. D. 1984. Effect of a zwitterionic detergent on the state of aggregation and catalytic activity of cytochrome P-450LM2 and NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* **259**:2390-2395.
- Wagner, S. L., Gray, R. D. 1985. Effects of detergent on substrate binding and spin state of purified liver microsomal cytochrome P-450LM2 from phenobarbital-treated rabbits. *Biochemistry* **24**:3809-3814.
- Wei, C., McLaughlin, C. S. 1974. Structure-function relationship in the 12,13-epoxytrichothecenes, novel inhibitors of protein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **57**:838-844.
- Woloshuk, C. P., Prieto, R. 1998. Genetic organization and function of the aflatoxin B1 biosynthetic genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**:169-176.
- Yabe, K., Nakamura, Y., Nakajima, H., Ando, Y., Hamasaki, T. 1991. Enzymatic conversion of norsolorinic acid to averufin in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1340-1345.
- Yasukochi, Y., Masters, B. S. 1976. Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c (cytochrome P-450) reductase purified by biospecific affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **251**:5337-5344.
- Yoshizawa, T., Takeda, H., Ohi, T. 1983. Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals. *Agric. Biol. Chem.* **47**:2133-2135.
- Yu, J., Chang, P. K., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E. 1997. AvnA, a gene encoding a cytochrome P-450 monooxygenase, is involved in the conversion of averantin to averufin in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1340-1345.

- Zamir, L. O. 1986. Biosynthesis of 3-acetyldeoxynivalenol. Dans: Mycotoxins and Phycotoxins. Steyn, P. S., Vlegaar, R. (ed), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 109-124.
- Zamir, L. O., Devor, K. A. 1987a. Kinetic pulse-labeling study of *Fusarium culmorum*. Biosynthetic intermediates and dead-end metabolites. *J. Biol. Chem.* **262**:15348-15353.
- Zamir, L. O., Nadeau, Y., Nguyen, C.-D., Devor, K. A., Sauriol, F. 1987b. Mechanism of 3-acetyldeoxynivalenol biosynthesis. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 127-129.
- Zamir, L. O. 1989. Biosynthesis of 3-acetyldeoxynivalenol and sambucinol. *Tetrahedron* **45**:2277-2305.
- Zamir, L. O., Gauthier, M. J., Devor, K. A., Nadeau, Y., Sauriol, F. 1989. Trichodiene is a precursor of trichothecenes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 598-600.
- Zamir, L. O., Devor, K. A., Nikolakakis, A., Sauriol, F. 1990. Biosynthesis of *Fusarium culmorum* trichothecenes. The Roles of isotrichodermin and 12,13-epoxytrichothec-9-ene. *J. Biol. Chem.* **265**:6713-6725.
- Zamir, L. O., Devor, K. A., Morin, N., Sauriol, F. 1991a. Biosynthesis of trichothecenes. Oxygenation steps post-trichodiene. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1033-1034.
- Zamir, L. O., Devor, K. A., Sauriol, F. 1991b. Biosynthesis of the trichothecene 3-acetyldeoxynivalenol. Identification of the oxygenation steps after isotrichodermin. *J. Biol. Chem.* **266**:14992-15000.
- Zamir, L. O., Huang, L. 1992a. Synthesis of [16-¹⁴C]trichodiene the precursor to trichothecenes. *J. Labelled Compds. Radiopharm.* **31**:915-924.
- Zamir, L. O., Nikolakakis, A., Sauriol, F. 1992b. Target-oriented inhibitors of the late stages of trichothecene biosynthesis. 1. Design, syntheses, and proof of structures of putative inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* **40**:676-680.
- Zamir, L. O., Rotter, B., Devor, K. A., Vairinhos, F. 1992c. Target-oriented inhibitors of the late stages of trichothecene biosynthesis. 2. *In vivo* inhibitors and chick embryotoxicity bioassay. *J. Agric. Food Chem.* **40**:681-685.
- Zamir, L. O., Devor, K. A., Nikolakakis, A., Sauriol, F. 1996. Biosynthesis of the trichothecene 3-acetyldeoxynivalenol: cell-free hydroxylations of isotrichodermin. *Can. J. Microbiol.* **42**:828-834.

- Zamir, L. O., Nikolakakis, A., Huang, L., St-Pierre, P., Sauriol, F., Sparace, S., Mamer, O. 1999a. Biosynthesis of 3-acetyldeoxynivalenol and sambucinol. Identification of the two oxygenation steps after trichodiene. *J. Biol. Chem.* **274** (sous presse)
- Zamir, L. O., Nikolakakis, A., Sauriol, F., Mamer, O. 1999b. Biosynthesis of trichothecenes and apotrithothecenes biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* **47** (sous presse)