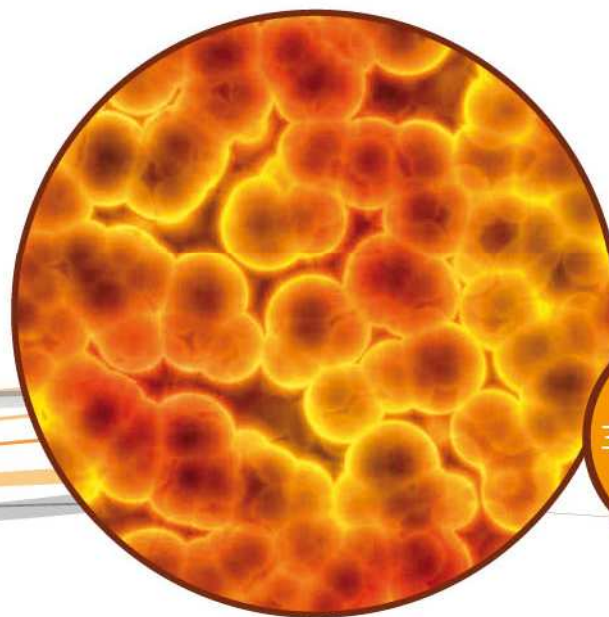


Les rencontres scientifiques de l'Anses

Restitution du programme national de recherche environnement santé travail

De l'émergence à la résurgence des agents biologiques : caractérisation des facteurs de risque pour l'homme

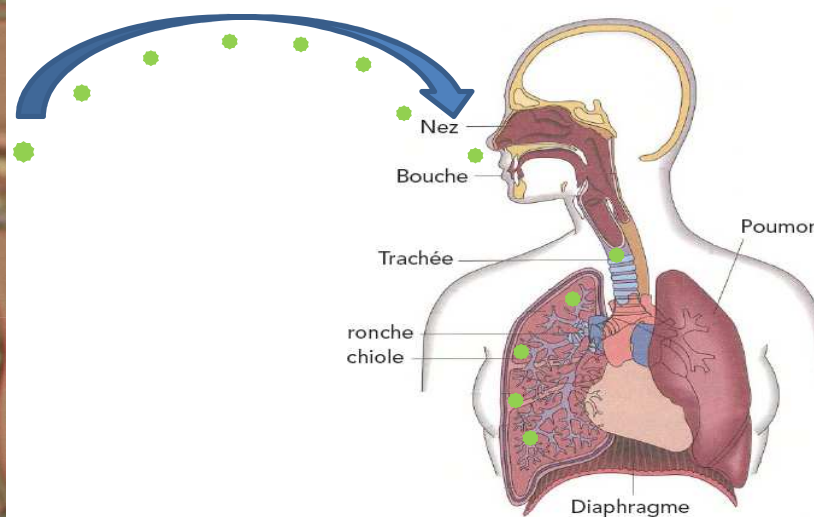
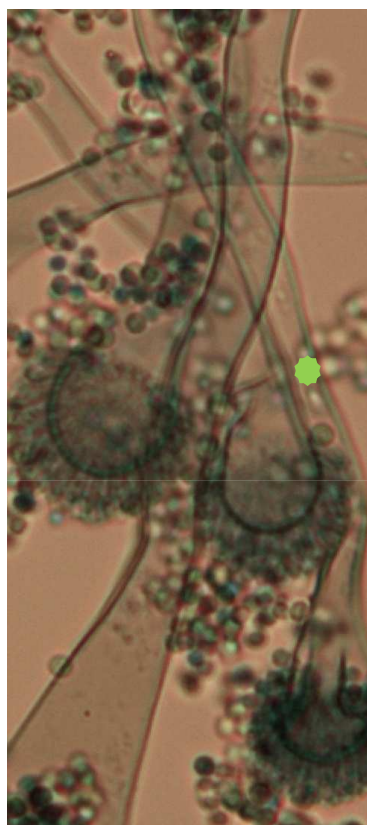


Mercredi
30 novembre
2011

Maison internationale, Paris 14^e

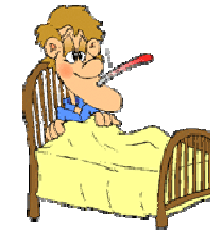
Evaluation de la toxicité de métabolites secondaires produits par les spores d'*Aspergillus fumigatus*

Thierry GAUTHIER – UMR 1331 TOXALIM – INRA Toulouse



Aspergillus fumigatus

- ❖ Champignon saprophyte, peut pousser sur différents matériaux
- Extérieur: matières organiques comme céréales, l'orge germé, foin tassé, compost, tabac
- Intérieur: dans les habitations humides et les vieux papiers.
- La tailles des spores (2 à 3 μm) leur permet de progresser tout au long du tractus respiratoire jusqu'aux alvéoles pulmonaires

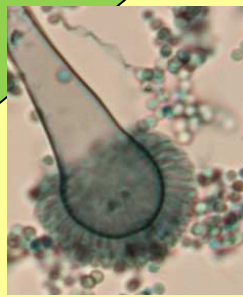


Seconde cause de mortalité par infection fongique à l'hôpital.

- ✓ Aspergillose invasive chez les malades immunodéprimés
- ✓ Aspergillose bronchopulmonaire allergique chez les personnes atteintes d'asthme ou de mucoviscidose
- ✓ Rhinite chez les personnes travaillant dans des locaux humides et moisiss
- ✓ Aspergillome lorsque le champignon peut se développer dans une cavité préexistante dans le poumon

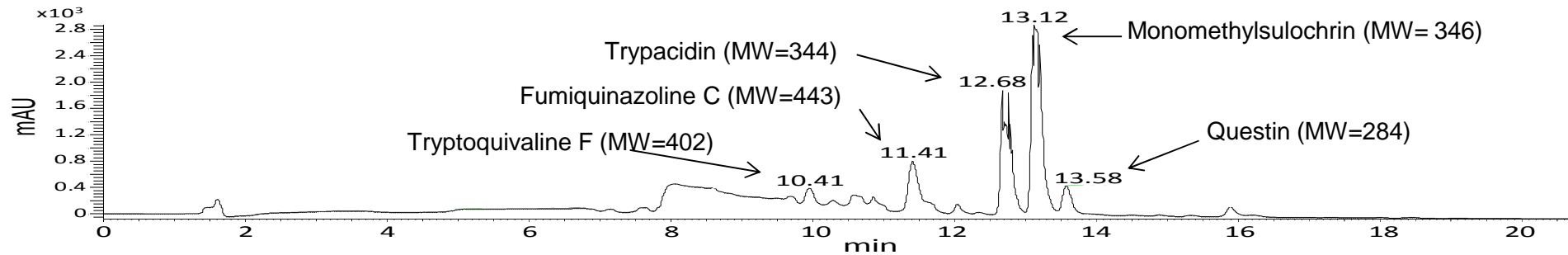
Peu de données concernant les métabolites portés par les spores et pas de données sur leurs effets toxiques sur les cellules pulmonaires

Toxines véhiculées
par les spores
d'*A. fumigatus*

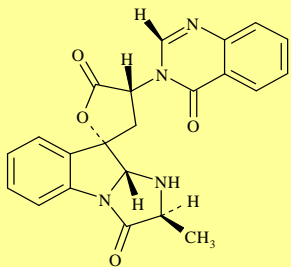


1) Identification des métabolites secondaires d'*Aspergillus fumigatus* véhiculées par les spores

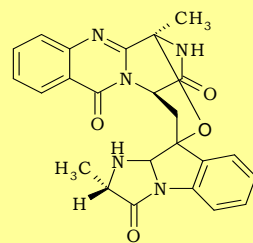
Analyse LC-MS de l'extrait de spores



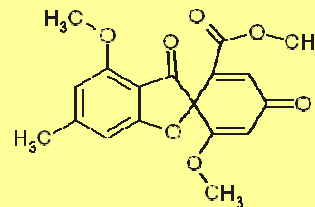
Tryptoquivaline F



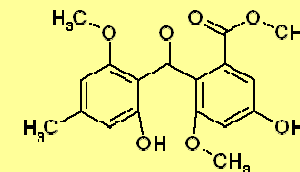
Fumiquinazoline C



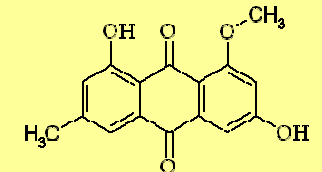
Trypacidine



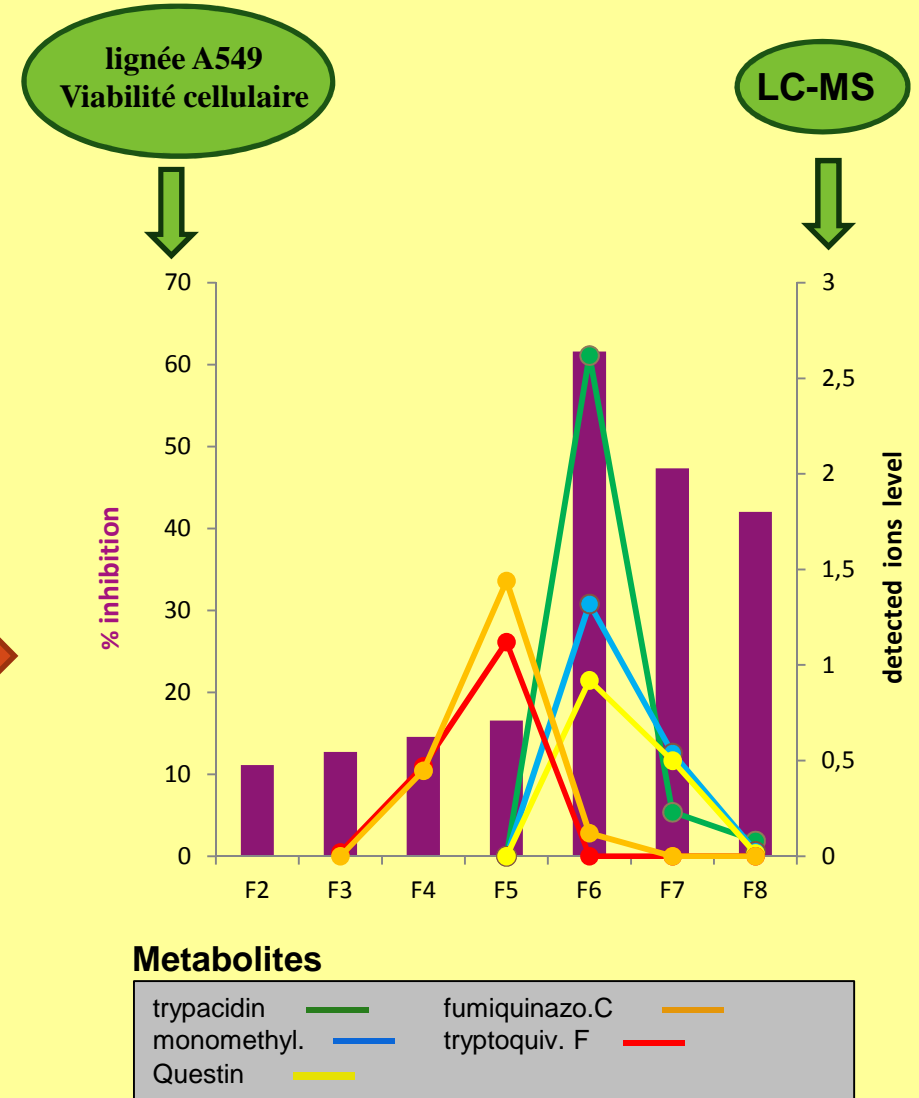
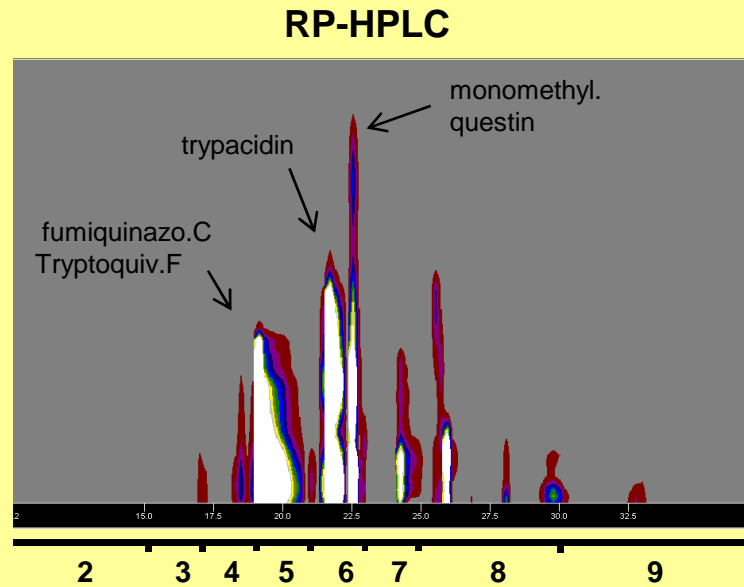
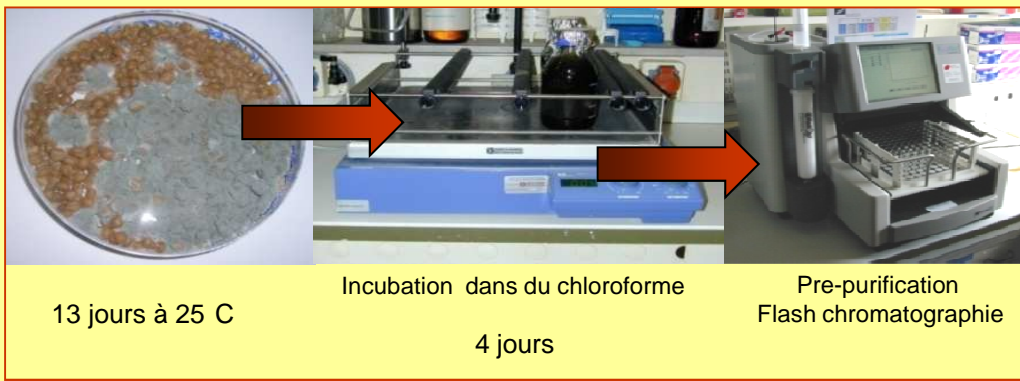
Monomethylsulochrine



Questine



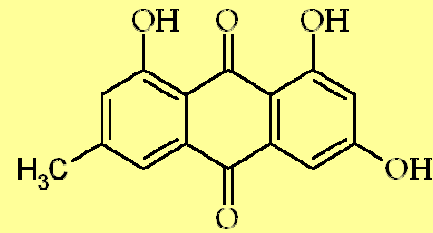
2) Toxicité des métabolites portées par les spores



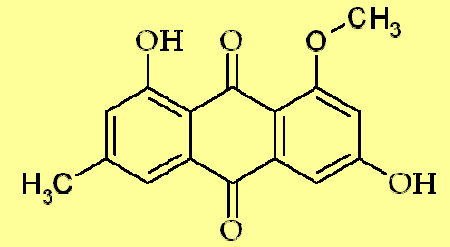
- Les fractions contenant de la **fumiquinazoline C** et de la **tryptoquivaline F** présentent une faible activité toxique

la présence des 3 métabolites **trypacidine**, **monomethylsulochrine** et **questine** est associée à un pic de toxicité

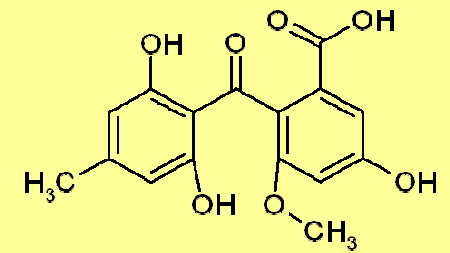
Synthèse métabolique de la
trypacidine chez *A. fumigatus*



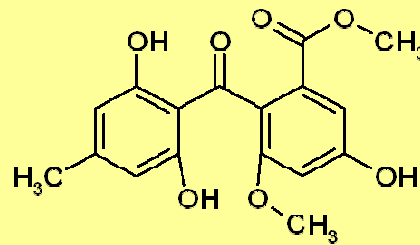
Emodine



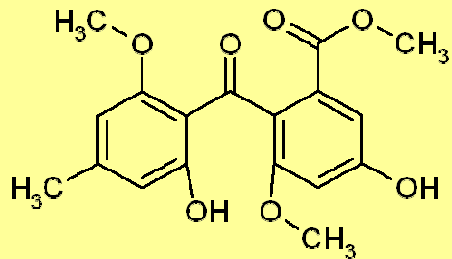
Questine



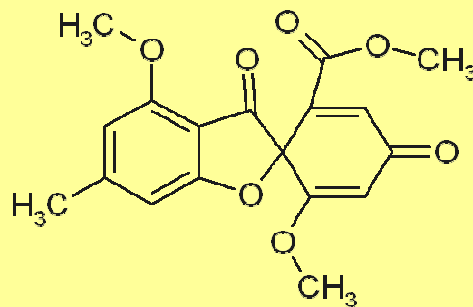
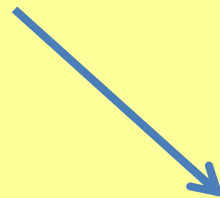
Desmethylsulochrine



Sulochrine



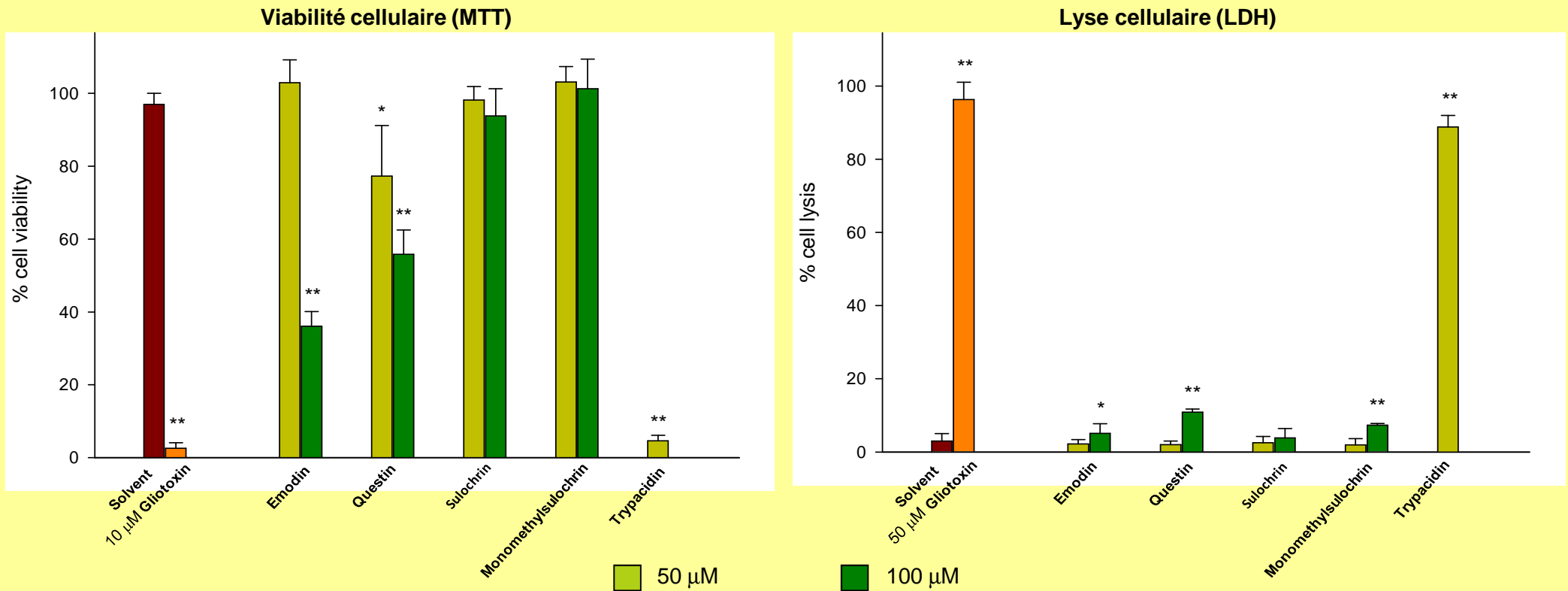
Monomethylsulochrine



Trypacidine

3) Toxicité de la trypacidine vs ses précurseurs métaboliques

- 100 μM de sulochrine et monomethylsulochrine montrent peu d'effet toxique.
- 100 μM d'emodine et de questine induisent une perte de viabilité mais très peu de lyse cellulaire
- 50 μM de trypacidine provoque une toxicité très importante: inhibition de 95% de la viabilité et 90% de cellules lysées



Cellules A549 exposées pendant 24h à 50 μM et 100 μM de métabolites

IC₅₀ trypacidine	7,4 ± 2,0 μM (N=5)	7,4 ± 2,4 μM (N=5)
------------------------------------	---	---

4) Comparaison de la toxicité induite par différents temps d'exposition à la trypacidine

% viabilité cellulaire mesurée après 24H de culture	Temps d'exposition à la trypacidine		
	1h	2h	24h
Trypacidine 50 μ M	2 \pm 2	3 \pm 2	1 \pm 1
Trypacidine 10 μ M	43 \pm 3	41 \pm 2	38 \pm 5

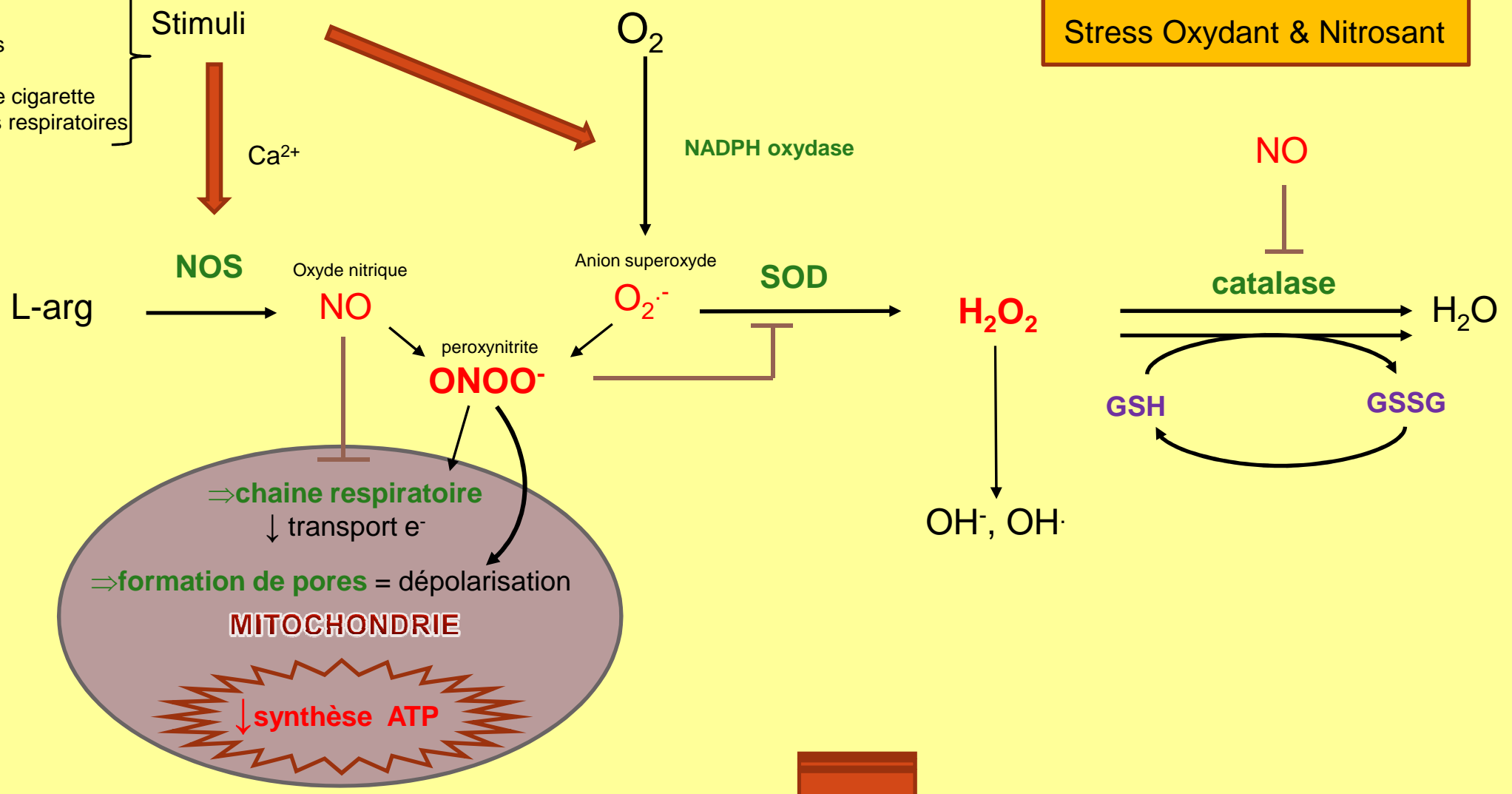
Dosage MTT sur cellules A549

La première heure d'exposition à la trypacidine induit un processus irréversible qui conduit à une perte de viabilité au bout de 24h

Allergenes
toxines
Polluants
Ozone
fumée de cigarette
Maladies respiratoires

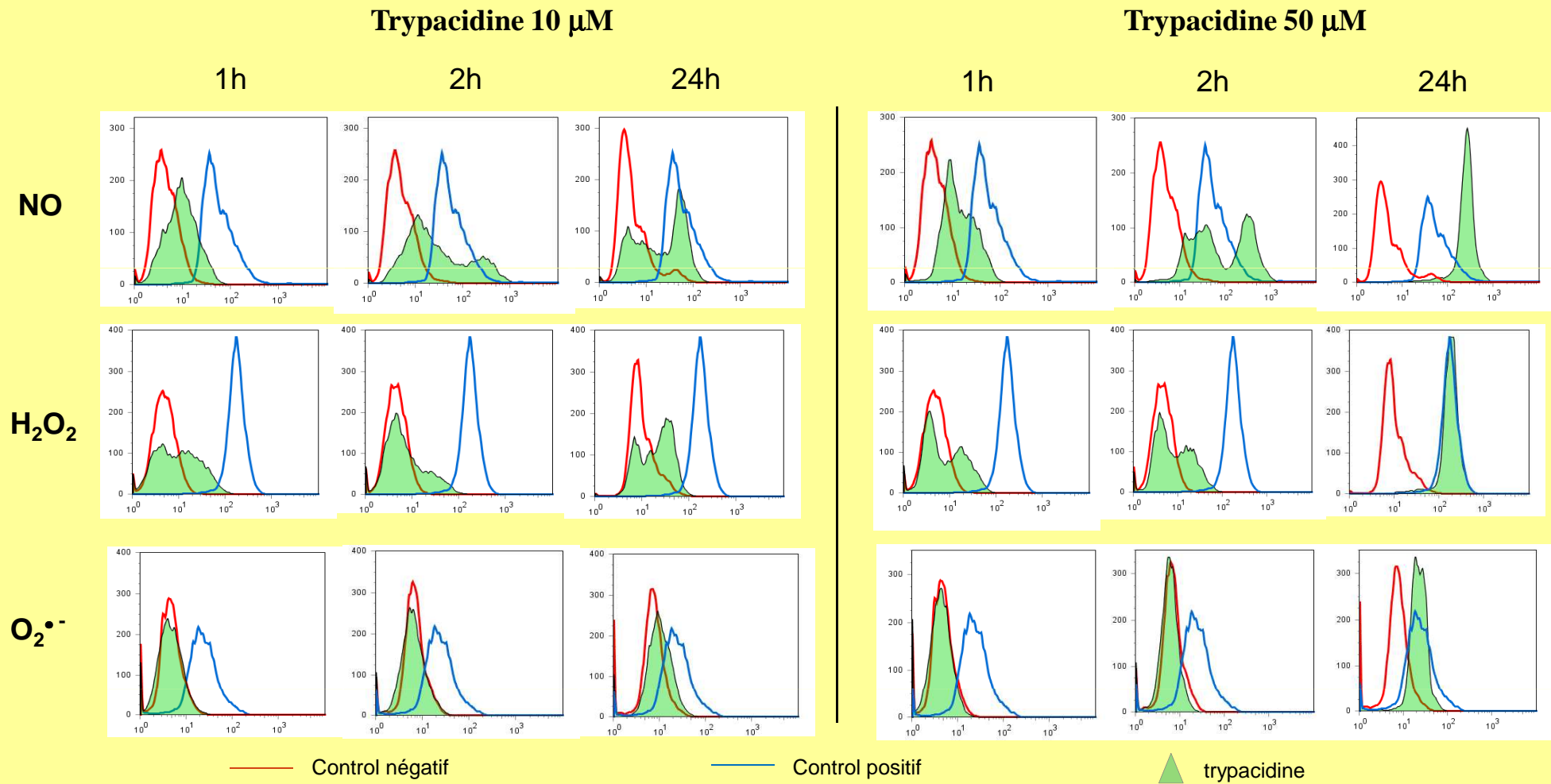
Stimuli

Stress Oxydant & Nitrosant



- Cassures ADN
- Dysfonctionnement de protéines
- Peroxydation de lipides
- Inhibition de la respiration MT

5.1) Effet de la trypacidine sur la production de ROS et RNS



☞ La trypacidine induit un stress oxydant et la production de NO dès les premières heures d'exposition, suivi d'un stress sévère après 24h d'exposition.

5.2) Stress oxydant après 2h et 24h d'exposition à 50 μ M trypacidine

IP \uparrow
 \rightarrow
 H_2O_2

IP \uparrow
 \rightarrow
NO

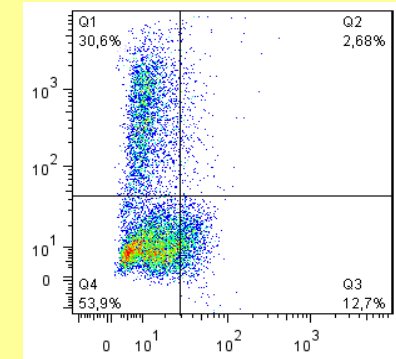
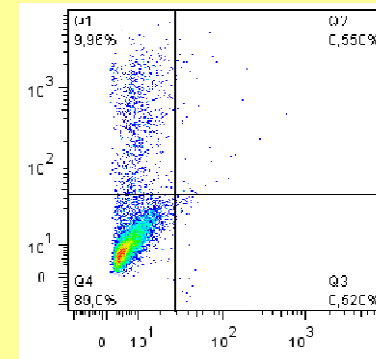
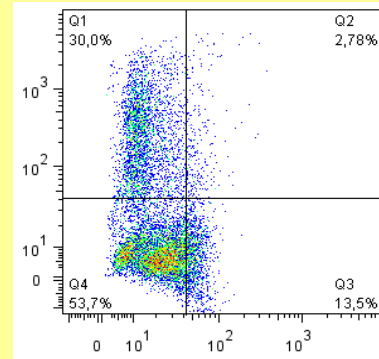
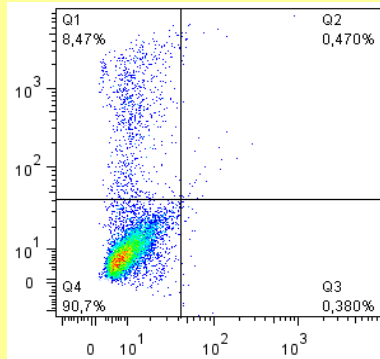
controle

Trypacidine

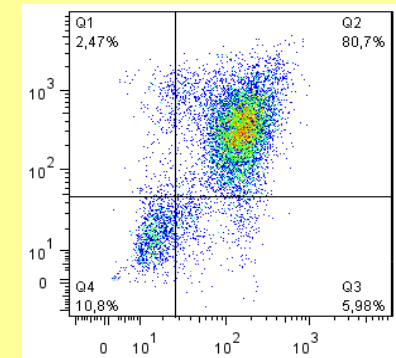
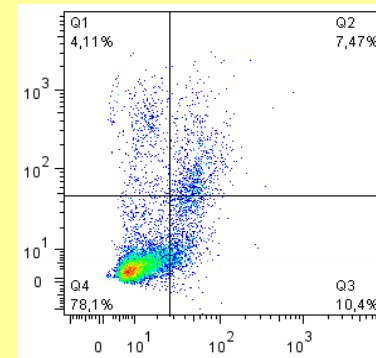
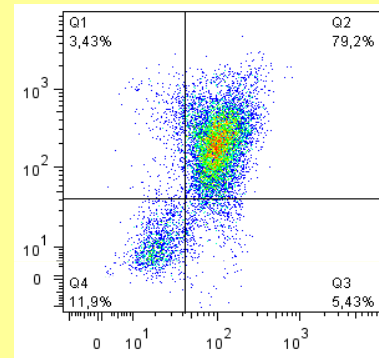
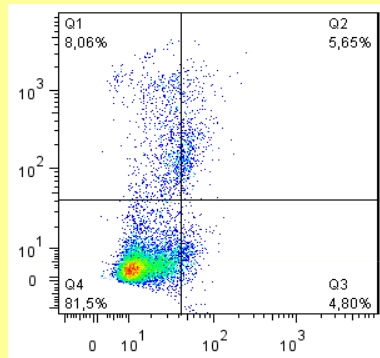
controle

Trypacidine

2 h



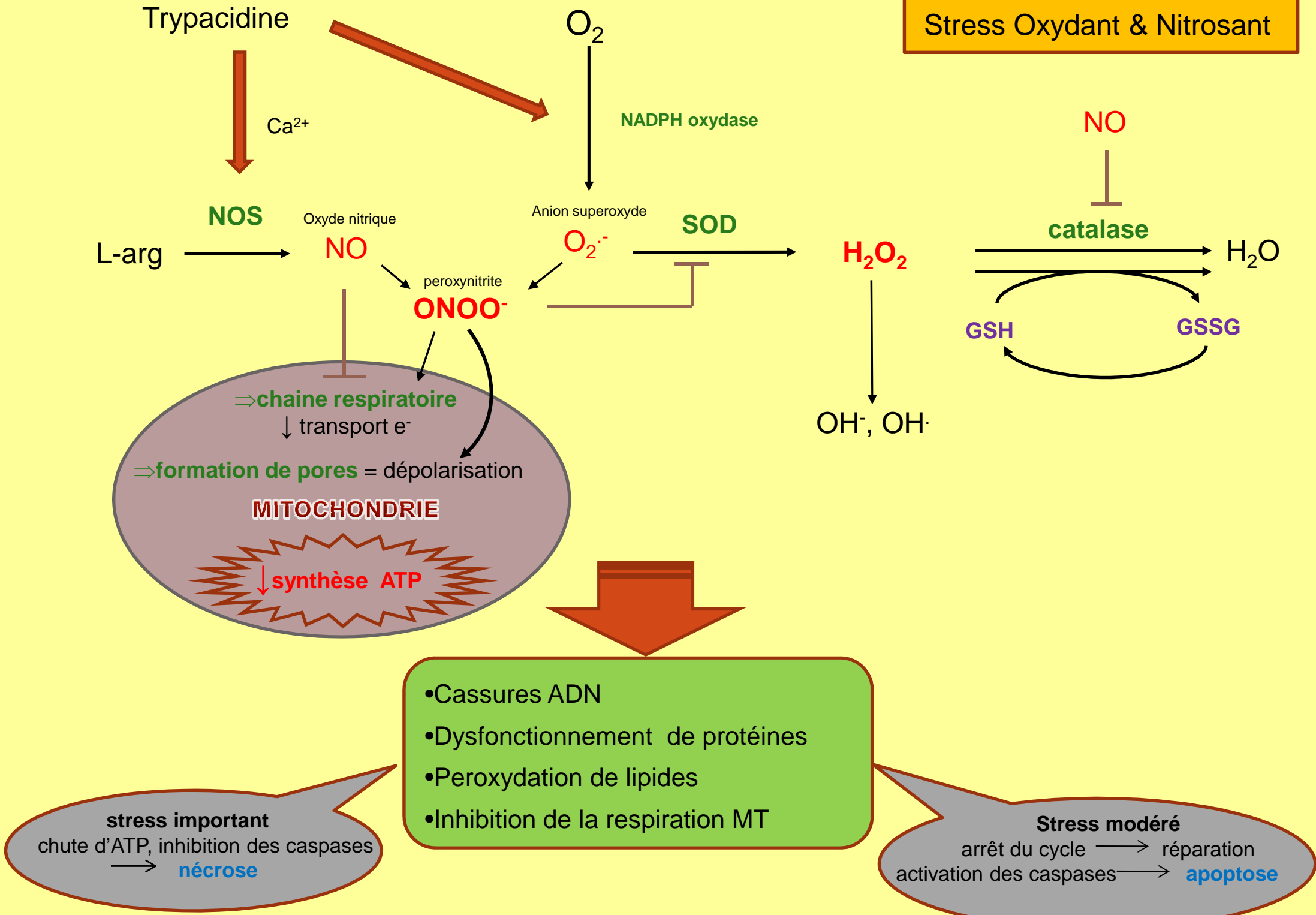
24 h



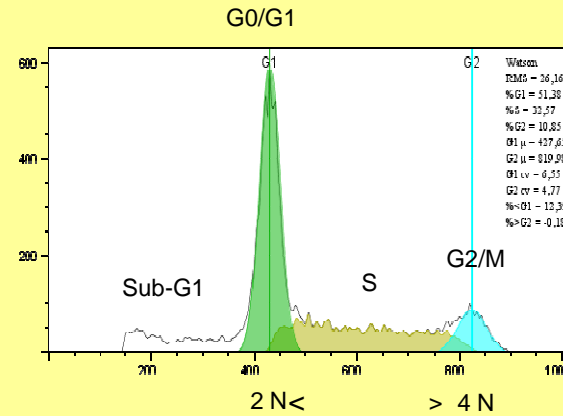
☞ Après 2 h d'exposition, la trypacidine provoque la mort cellulaire d'une partie de la population (20%) et un stress oxydatif d'une autre partie (15%).

☞ Au bout de 24h, les cellules qui ont subi un stress oxydant sont mortes.

Stress Oxydant & Nitrosant

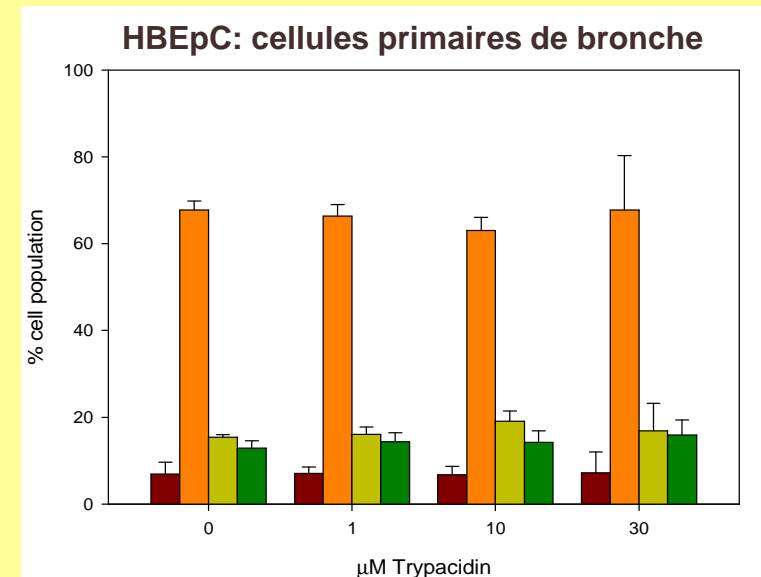
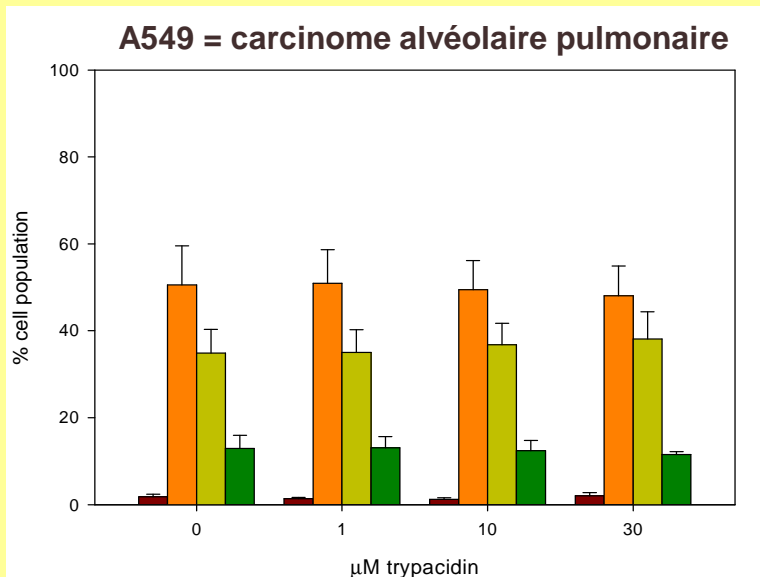


6) Effet de la trypacidine sur le cycle cellulaire



MTT/IC₅₀ = 7,4 ± 2,0 μM

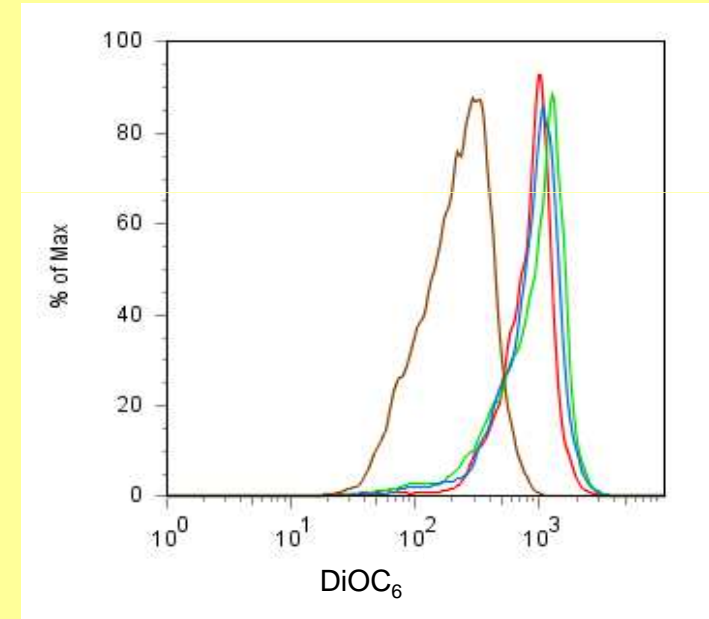
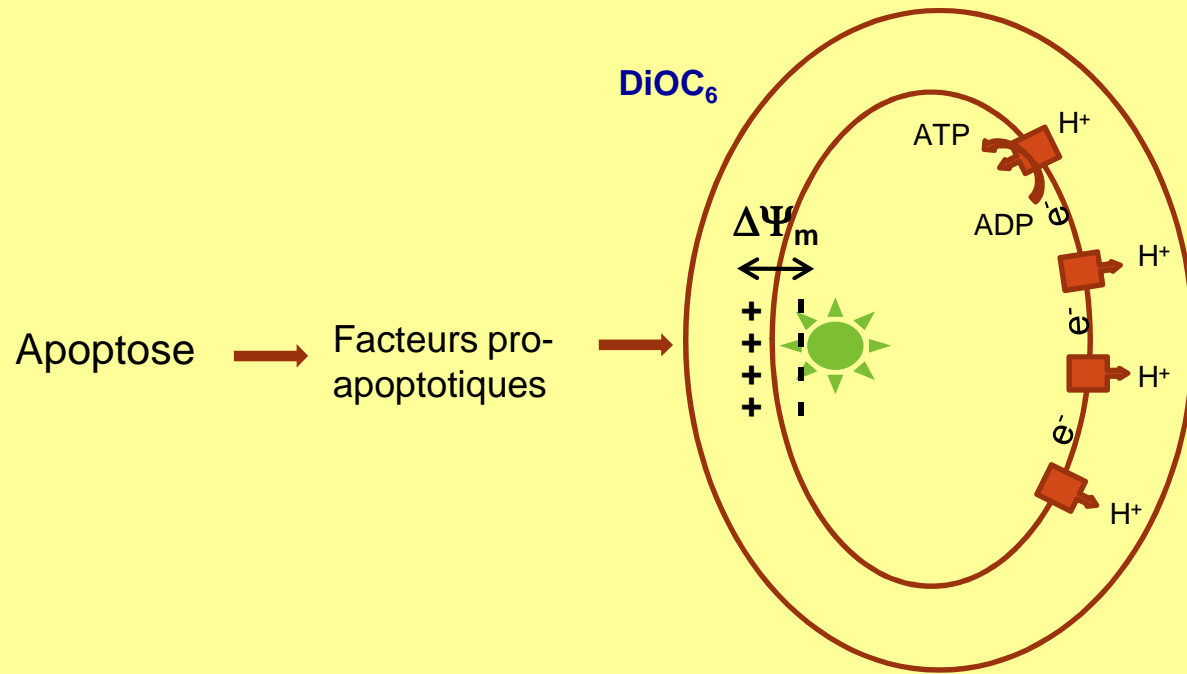
MTT/IC₅₀ = 9,2 ± 2,0 μM



■ Sub-G1 ■ G₀/G₁ ■ S ■ G₂/M

- ☞ **Aucun effet sur les différentes phases du cycle**
- ☞ **Absence de population sub-G1: pas d'induction d'apoptose**

7) Mesure du potentiel membranaire mitochondrial Après 2h et 24h d'exposition à la trypacidine



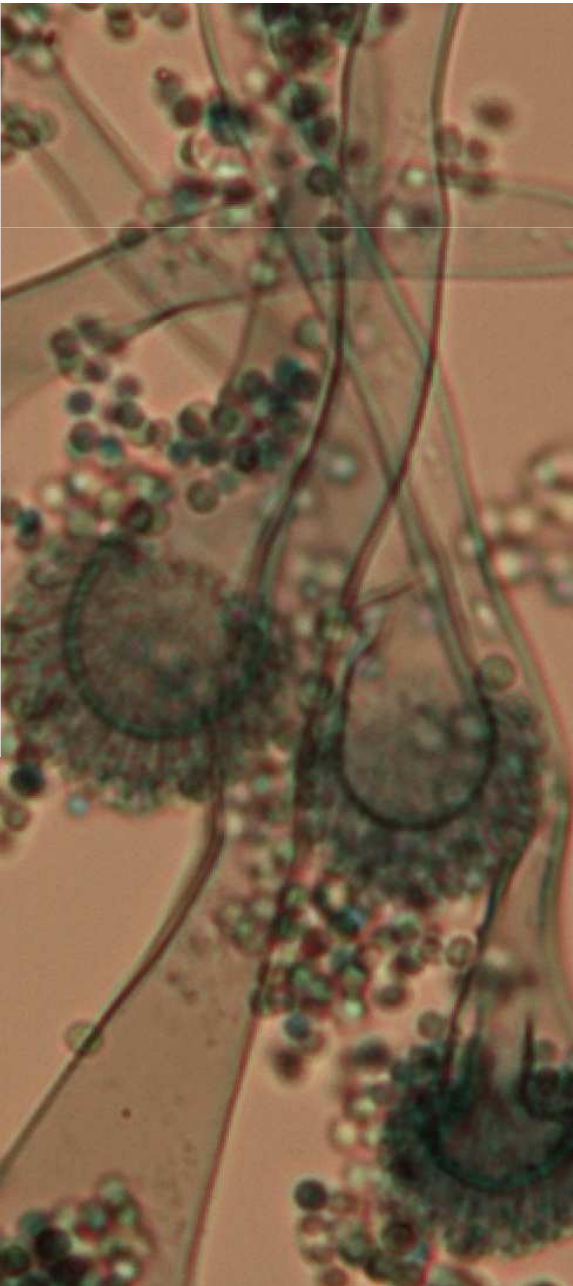
- control
- trypacidin 10 μM
- Trypacidin 50 μM
- FCCP (Fluoro-carbonylcyanide phenylhydrazone)

L'absence de diminution du PMM confirme que le trypacidine n'induit pas d'apoptose



Principales conclusions

- La trypacidine est le métabolite le plus toxique véhiculé par les spores d'*A. fumigatus*: première démonstration de son activité toxique contre des cellules pulmonaires.
- Une heure d'exposition à la trypacidine suffit pour induire un mécanisme de mort cellulaire impliquant un stress oxydant et conduisant à la lyse cellulaire dans les 24 heures
- La trypacidine n'induit pas d'arrêt du cycle cellulaire, ni un processus apoptotique mais provoque une nécrose cellulaire.



Equipe Immuno-Toxicologie UMR 1331 - **ToxAlim**

- Marie-Pierre Artigot (master 2)
- Xiaodi Wang (master 2)
- Athanasios Fysikopoulos (master 2)
- Joice Sifuentes Dos Santos (post-doc)



Equipe IMT

- Souria Tadrict
- Nicolas Loiseau
- Olivier Puel
- Isabelle Oswald

Plate-forme Axiom: Cécile Canlet

