

50376
1975
83

N d'ordre : 535

50376
1975
83

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

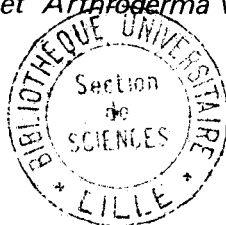
Docteur de Troisième Cycle

par

Lucien DUJARDIN

ETUDE DES EQUILIBRES NUTRITIFS FAVORABLES A LA CROISSANCE
ET A LA REPRODUCTION SEXUEE DE DEUX GYMNOASCACEAE :

Arachniotus albicans Apinis et Arthroderma vanbreuseghemii Takashio.



membres du jury: M.M. R. BOURIQUET, *président*
L. LACOSTE, *rapporteur*
E. BONNOT, *examinateur*
J. BIGUET } *membres invités*
F. MARIAT }

soutenue le 20 juin 1975

AVANT - PROPOS

-:~::~:~::~:-

Le présent travail a été réalisé dans les laboratoires de Parasitologie de l'U.E.R. de Pharmacie de Lille et de Cryptogamie de l'U.E.R. de Biologie à l'Université des Sciences et Techniques de Lille.

Monsieur le Professeur BIGUET m'a confié l'étude de la sexualité des champignons pathogènes pour l'homme et les animaux, et Monsieur le Professeur LACOSTE m'a fait profiter de sa très grande expérience de la physiologie fongique. Je ne serais sans doute jamais parvenu à un résultat sans le secours et les conseils de l'un et de l'autre. Je les remercie d'avoir éveillé mon intérêt pour le monde des champignons et de m'avoir prodigué leurs conseils et leurs encouragements tout au long de ce travail.

Je prie Monsieur le Professeur BOURIQUET de croire à ma profonde reconnaissance ; j'ai toujours trouvé auprès de lui une bienveillante compréhension. Je le remercie d'avoir bien voulu me faire l'honneur de présider mon Jury.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur BONNOT qui a bien voulu s'intéresser à mon travail et faire partie de ce Jury.

Monsieur MARIAT, Chef du Département de Biologie fongique à l'Institut Pasteur de Paris, a encouragé la poursuite de mes recherches après les premiers résultats sur Arachniotus albicans. Je lui en suis très reconnaissant et le remercie d'avoir accepté de participer à ce Jury.

Je remercie également tous ceux qui m'ont aidé de leur expérience et soutenu dans les moments de lassitude.

P L A N

-:--

	Pages
INTRODUCTION.....	1
LA FAMILLE DES <u>GYMNOASCACEAE</u> - SYSTEMATIQUE ET BIOLOGIE -.....	3
DEFINITION.....	3
CLASSIFICATION.....	3
LES ESPECES PARASITES DE L'HOMME ET DES ANIMAUX.....	5
CONDITIONS DE LA REPRODUCTION SEXUEE.....	7
- <i>action de la température</i>	8
- <i>action de la lumière</i>	8
- <i>influence de la composition du milieu de culture</i>	9
- <i>facteurs internes, compatibilité des souches</i>	11
MILIEU DE CULTURE SYNTHETIQUE ET REPRODUCTION SEXUEE - ETUDE CHEZ <u>ARACHNIOTUS ALBICANS</u>	14
MATERIEL ET TECHNIQUES.....	14
REPRODUCTION SEXUEE SUR DES MILIEUX DE CULTURE NATURELS ET SEMI-SYNTHETIQUES.....	15
- <i>milieu à base d'avoine</i>	15
- <i>milieu YpSs</i>	16
- <i>milieu de Sabouraud dilué</i>	17
REPRODUCTION SEXUEE SUR DES MILIEUX DE CULTURE SYNTHETIQUES.....	18
- <i>choix d'une source de carbone</i>	19
- <i>choix d'une source d'azote</i>	20
- <i>influence de l'équilibre carbone/azote et de la concen- tration en carbone et en azote</i>	21
- <i>influence du pH</i>	23
- <i>conclusion</i>	26
CROISSANCE ET REPRODUCTION SEXUEE D' <u>ARTHRODERMA VANBREUSEGHEMII</u>	30
CROISSANCE ET REPRODUCTION SEXUEE SUR LE MILIEU DE SABOURAUD DILUE ET SES MODIFICATIONS.....	30

- étude de la croissance d' <i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> sur le milieu proposé par Takashio.....	31
- modification du milieu de Takashio en vue de remplacer la néopeptone.....	33
- essais de substitution de la néopeptone.....	36
- croissance sur des mélanges d'acides aminés.....	39
. néopeptone reconstituée.....	39
. mélanges de 5 ou 6 acides aminés.....	39
 SOURCE AZOTEE ET CROISSANCE.....	43
- voies de synthèse des acides aminés.....	43
- croissance sur les acides glutamique et aspartique et la sérine.....	45
- effets des acides aminés aromatiques et de l'histidine....	47
- effets de deux acides aminés aromatiques.....	51
- effets de l'acide shikimique.....	51
 EQUILIBRE DU MILIEU DE CULTURE ET REPRODUCTION SEXUEE.....	55
- choix d'une source de carbone.....	55
- équilibre carbone - azote.....	57
- essai comparé de milieux synthétiques, du milieu de Sabou- raud dilué et du milieu à base d'avoine pour l'obtention de périthèces de dermatophytes.....	59
- reproduction sexuée de deux souches peu compatibles d' <i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	65
 CONCLUSION.....	68
 BIBLIOGRAPHIE.....	71

-:~::~:~::~:~::~:~::~:~::~:-

I N T R O D U C T I O N

-:-:-:-

La découverte des formes sexuées de certains champignons pathogènes de l'homme a permis de classer les dermatophytes et les agents des mycoses viscérales dans la famille des Gymnoascaceae. Cette connaissance de la reproduction sexuée a abouti à la publication d'études génétiques ayant trait à la morphologie, à la virulence, à la résistance aux antibiotiques de ces champignons ; KWON-CHUNG (1974) en a présenté une revue.

Les problèmes d'évolution et de formation des espèces sont liés à des phénomènes d'isolement génétique. Le groupe des dermatophytes comprend une série d'espèces et de variétés proches les unes des autres dont certaines sont saprophytes, les autres parasites. Ce groupe semble donc être un matériel de choix pour l'étude de l'évolution et de l'adaptation au parasitisme. Des incompatibilités ont été mises en évidence au sein de plusieurs espèces, et la curiosité nous pousse à en étudier le déterminisme génétique.

Cependant, les phénomènes d'incompatibilités ne peuvent être étudiés que si l'on connaît bien les conditions de la reproduction sexuée, car on risque autrement d'appeler "incompatibilité" notre incapacité à faire fructifier sexuellement deux souches.

Nous avons donc décidé d'étudier les conditions externes de la reproduction sexuée, et c'est le but du travail présenté ici.

Les difficultés que nous avons rencontrées pour cultiver en milieu synthétique les espèces pathogènes de l'homme et des animaux,

nous ont incité à cultiver auparavant une espèce saprophyte de la même famille, Arachniotus albicans.

Il n'a pas été possible d'appliquer immédiatement nos premiers résultats à une espèce de dermatophyte, Arthroderma vanbreuseghemii; en effet, les souches de cette espèce refusaient de se développer sur les premiers milieux synthétiques utilisés, et il a été nécessaire d'effectuer une étude préalable, pour parvenir à une définition des besoins nutritifs assurant un développement complet de l'espèce étudiée.

LA FAMILLE DES GYMNOASCACEAE

Systematique et biologie

-:-:-:-

DEFINITION.

Selon la terminologie adoptée dans "The Fungi" de AINSWORTH, SPARROW et SUSSMAN (1973), la famille des Gymnoascaceae fait partie de la classe des Ascomycotina, et de la sous-classe des Plectomycetes qui comprend l'ordre unique des Eurotiales.

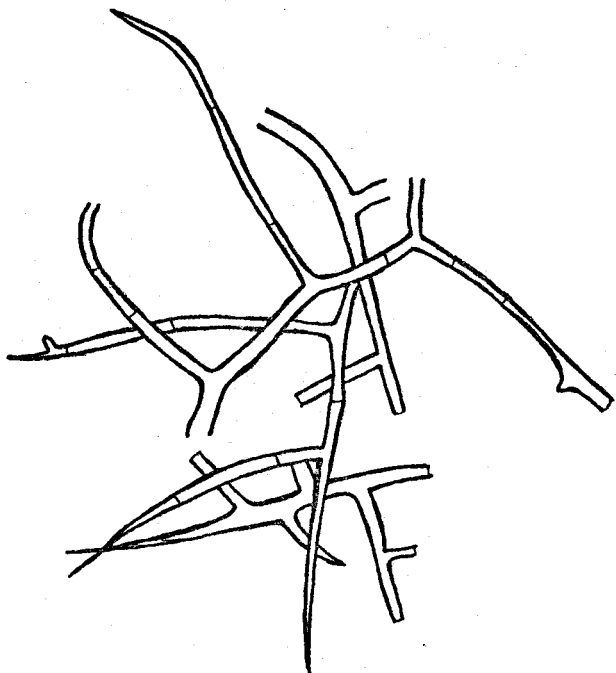
Les Eurotiales sont des champignons produisant des ascocarpes clos (type périsporié) dans lesquels les asques sont ronds, évanescents, et disposés sans ordre (type plectascé). Ces ascocarpes sont nommés cleistothèces ou périthèces.

Les Gymnoascaceae se distinguent des autres Eurotiales par le fait que la paroi de leur cleistothèce est formée d'un simple flocon d'hyphe entremêlées et quelquefois anastomosées ; selon CHADEFAUD (1960) cette paroi est une ascothécie, c'est à dire une paroi formée à partir de filaments recouvrants nés sur le pied de l'ascogone. Cela est indiscutable chez certaines espèces, Arachniotus lectardii par exemple ; cependant ORR, KUEHN et PLUNKETT (1963) notent, chez Gymnoascus reessii, la participation du mycélium végétatif se trouvant au voisinage des ébauches de périthèces à l'édification de la paroi de ce périthèce.

CLASSIFICATION.

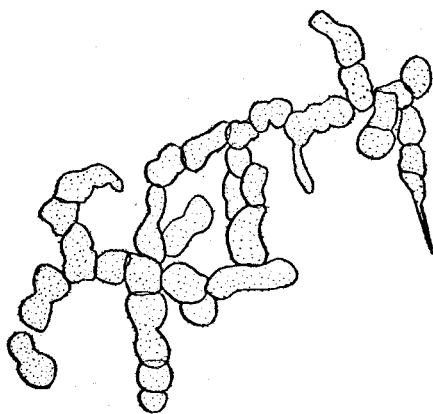
APINIS (1964) a proposé la création de trois sous-familles chez les Gymnoascaceae, le critère qui différencie ces sous-familles étant la structure de la paroi de l'ascocarpe (voir aussi la figure 1).

Figure 1 : Hyphes de la paroi du clefsthèce dans les trois sous-familles de Gymnoascaceae.



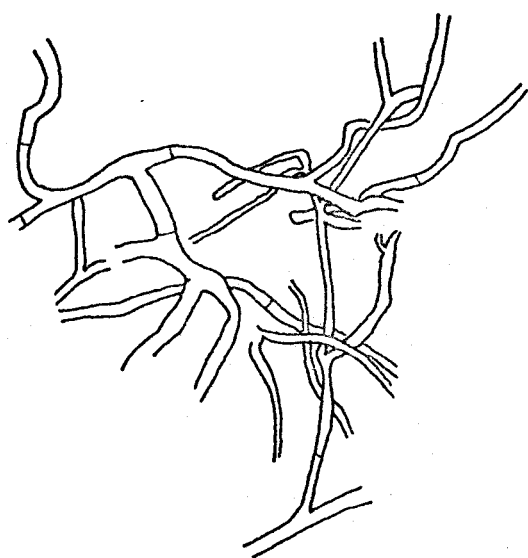
Chez les Gymnoascoideae :

hyphes à paroi épaisse
(Gymnoascus reessii)




Chez les Arthrodermoideae :

hyphes divisées en articles
(Arthroderma vanbreuseghemii)



Chez les Arachnietoideae :

hyphes à paroi mince, semblables
aux filaments végétatifs
(Arachnietus albicans).

Echelle :  10 μ



- Chez les Gymnoascoideae, dont le type est le genre Gymnoascus Baranetzky 1872, le périthèce a sa paroi formée d'hyphes à paroi épaisse, septées, anastomosées ou divisées ; ces hyphes forment aussi des appendices longs ou courts, désignés sous le nom de fulcres par CHADEFAUD.

- Les hyphes ascothéciennes des Arthrodermoideae sont à paroi épaisse ou mince, elles sont septées et divisées en articles, ce qui les distingue de celles des Gymnoascoideae. Des appendices variés droits, flexueux ou en forme de vrilles ornent les périthèces. Les espèces de Gymnoascaceae impliquées dans la pathologie humaine et animale appartiennent toutes à cette sous-famille.

- La paroi du périthèce dans la troisième sous-famille : les Arachniotidae, est la moins différenciée. Elle est formée d'hyphes semblables aux filaments végétatifs, à paroi mince. Cette ascothécie peut être très réduite comme dans le genre Petalosporus (GHOSH, ORR et KUEHN 1963) ; ou même formée de quelques filaments nés du pied de l'ascogone, mais qui ne forment plus une paroi chez Arachniotus lectardii par exemple (DURAND 1969). A cette sous-famille appartient Arachniotus albicans dont nous étudions la reproduction sexuée dans le présent travail.

LES ESPECES PARASITES DE L'HOMME ET DES ANIMAUX.

Dès 1899, MATRUCHOT et DASSONVILLE avaient pressenti l'appartenance à la famille des Gymnoascaceae des champignons responsables des teignes. En 1927, NANNIZZI cultive sur de la terre humide mélangée avec des morceaux de cuir et de plumes une souche d'origine humaine de Microsporum gypseum, et obtient des périthèces fertiles d'une Gymnoascaceae qu'il classe dans le genre Gymnoascus sous le nom G. gypseus.

Cette découverte sera par la suite contestée et il faudra attendre 1961 pour que STOCKDALE redécouvre cette forme sexuée de M.

gypseum et crée pour elle un nouveau genre, Nannizzia, appartenant à la famille des Gymnoascaceae.

Par la suite sont décrites les formes parfaites de divers Trichophyton et Microsporium qui appartiennent respectivement aux genres Arthroderma et Nannizzia.

Arthroderma, genre décrit par BERKELEY en 1860 pour l'espèce saprophyte A. curreyi, est très voisin de Nannizzia. Ces deux genres comprennent des espèces toutes hétérothalliques à l'exception d'Arthroderma curreyi.

Les espèces de Nannizzia et d'Arthroderma ont en commun la possibilité de pouvoir se développer à partir de kératine comme substrat. Cette possibilité a été exploitée pour les isoler du sol par VANBREUSEGHEM (1952), et par de nombreux auteurs par la suite. Cette technique de piégeage à l'aide de kératine démontrait l'existence dans le sol de spores de ces champignons. Certaines espèces n'ont jamais été trouvées parasites chez les animaux et doivent donc mener une vie saprophyte dans le sol, bien que l'on ne sache pas exactement dans quel biotope. D'autres espèces, également isolées du sol, peuvent mener une vie parasitaire, et on connaît tous les intermédiaires entre des espèces saprophytes et des espèces exclusivement parasites. De ce fait, le groupe des dermatophytes semble intéressant pour l'étude de l'évolution vers un mode de vie parasitaire. L'existence de races incompatibles entre elles au sein de certaines espèces augmente encore cet intérêt.

Un second groupe de champignons parasites de l'homme, les agents des mycoses viscérales, s'est révélé appartenir à la famille des Gymnoascaceae. Ces agents, des genres imparfaits Histoplasma, Blastomyces, Paracoccidioides, provoquent des affections pulmonaires qui peuvent ensuite se généraliser.

En 1967, Mc DONOUGH et LEWIS croisent différentes souches de Blastomyces dermatitidis, et obtiennent des périthèces. Ils créent

le genre Ajellomyces pour cette espèce qu'ils nomment A. dermatidis.

KWON CHUNG (1972) décrit le stade sexué d'Histoplasma capsulatum, et lui donne le nom d'Emmonsiella capsulata. Emmonsiella et Ajellomyces sont deux genres voisins.

ANDRIEU et collaborateurs (1969) ont montré l'étroite parenté qui existe entre les différents agents de mycoses profondes par l'étude des communautés antigéniques de ces espèces. On peut par conséquent affirmer que l'ensemble de ce second groupe de champignons appartient lui aussi à la famille des Gymnoascaceae, qui occupe de ce fait une place importante en mycologie médicale.

La découverte de ces différentes formes sexuées ouvrait des possibilités de recherches nouvelles. Il devenait possible d'étudier génétiquement la descendance de deux souches. Cependant, bien que plusieurs auteurs aient réussi à obtenir des périthèces de champignons pathogènes de l'homme et des animaux, il n'est pas aisé de les produire. Les travaux que nous allons passer en revue dans le paragraphe suivant ont été consacrés à la reproduction sexuée des Gymnoascaceae, néanmoins aucune étude systématique des conditions externes de cette reproduction n'a été menée.

CONDITIONS DE LA REPRODUCTION SEXUEE.

Assez peu de travaux ont été consacrés à la reproduction sexuée des Gymnoascaceae. Les auteurs se sont souvent contentés de décrire les espèces sur des milieux classiquement utilisés en mycologie. On trouve souvent mention d'extraits de malt, de farine d'avoine, et d'un milieu semi-synthétique appelé YpSs contenant de l'extrait de levure, de l'amidon, et des sels minéraux. Les températures auxquelles sont soumises les cultures ne sont pas toujours mentionnées, tandis que les conditions d'éclairement sont le plus souvent négligées.

Les recherches les plus importantes ont été faites sur les dermatophytes, en raison sans doute de l'intérêt que présente ce groupe. Voici ce que nous avons relevé dans la littérature :

- Action de la température :

AJELLO et CHENG (1967) ont obtenu des périthèces d'Arthroderma benhamiae à 25 et 30°C, tandis que WEITZMAN et SILVA-HUTNER (1967) ont conduit leurs expériences sur 7 espèces de dermatophytes à 23°C et ont observé la fructification sexuée à cette température. WIDRA (1965) cultive lui aussi Nannizzia grubyia à 23°C. DAWSON et GENTLES (1961) indiquent que la température de 24°C est meilleure que celle de 28°C pour l'obtention de cleistothèces d'Arthroderma curreyi, A. uncinatum et de Nannizzia obtusa. DAWSON, GENTLES et BROWN (1964) donnent les températures extrêmes permettant la reproduction sexuée d'A. uncinatum (15 à 28°C), d'A. quadrifidum (10 à 24°C) et de Nannizzia incurvata (22 à 30°C). DURAND (1969) étudie le développement d'Arachniotus lectardii à 20 et 30°C. Les températures comprises entre 20 et 25°C semblent convenir à la plupart des espèces qui ont été étudiées, et il n'est pas étonnant que l'on ne trouve pas davantage de travaux sur cette question, ces températures favorables étant celles communément utilisées par les mycologues.

- Action de la lumière :

Certains ascomycètes requièrent de la lumière pour leur reproduction sexuée ; c'est le cas, par exemple, de Pleospora herbarum (LEACH 1963), de divers Leptosphaeria (LACOSTE 1965), ou de Nectria galligena (DEHORTER 1972). D'autres sont photo-indifférents tel Sordaria fimicola (INGOLD et DRING 1957), d'autres encore sont inhibés par la lumière comme Gnomonia leptostypa (FAYRET 1967). En ce qui concerne les Gymnoascaceae, DAWSON, GENTLES et BROWN (1964) signalent que la lumière diminue la croissance et le nombre de périthèces produits par les dermatophytes qu'ils étudient. KWON-CHUNG (1969) a montré que la lumière empêche l'enroulement de l'ascogone autour du gamétocyste mâle chez Nannizzia incurvata.

7

- Influence de la composition du milieu de culture :

Ce sont encore les dermatophytes qui ont été l'objet des recherches dans ce sens. Ces champignons ont fourni des périthèces tout d'abord sur de la terre contenant de la kératine, ou encore recouverte de cette même substance. C'est sur un tel milieu que NANNIZZI (1927) a observé pour la première fois des fructifications parfaites de Microsporum gypseum. C'est également sur de la terre recouverte de crins que STOKDALE (1961) a retrouvé cette forme sexuée. Ce milieu peut être considéré comme le milieu-hôte de ces espèces kératinolytiques. C'est dans cet esprit que VANBREUSEGHEM (1952) l'avait préconisé dans sa "technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol".

C'est DE VROEY (1964) qui le premier essaye d'obtenir des périthèces de dermatophytes sur des milieux ne contenant pas de terre. Il utilise dans un premier essai un milieu gélosé contenant encore de la terre et 10 g/l de néopeptone Difco ; ce milieu, après ensemencement est recouvert de crins de cheval. Il n'obtient pas dans ces conditions la reproduction sexuée de Microsporum gypseum. Dans un autre essai, il utilise des milieux à base de graines qui avaient été préparés pour d'autres expériences. Cette fois encore il dépose des crins à la surface de la gélose et il obtient des cléistothèces fertiles. Par la suite il ajoute soit son premier milieu, soit seulement de la néopeptone à ces milieux favorables, qui de ce fait ne permettent plus la reproduction sexuée. Il conclut que la néopeptone a un rôle inhibiteur. Les résultats ultérieurs, ceux de TAKASHIO (1969, 1973) et les nôtres montrent que ce n'est pas la néopeptone qui est inhibitrice, mais plutôt la concentration en azote beaucoup trop élevée.

Dans le même travail DE VROEY relate l'essai d'un milieu à base de graines mais sans kératine. Il a dû être très surpris du résultat, obtention de périthèces, si bien qu'il n'en dit que trois lignes et ne poursuit pas dans cette voie. En effet, à cette époque on pensait que la kératine devait être indispensable à la reproduction sexuée de ces espèces kératinolytiques.

WEITZMAN et SILVA-HUTNER (1967) utilisent des milieux contenant 10 g/l de farine d'avoine, ou la même farine et des sels minéraux (KH_2PO_4 , MgSO_4 , NaNO_3) ou encore de la farine d'avoine additionnée de concentré de tomates. Ces milieux, et particulièrement le deuxième, sont très favorables à la reproduction sexuée des 5 espèces de Nannizzia et des 2 espèces d'Arthroderma qu'ils ont ensemencées. A la suite de ce travail, le milieu "avoine plus sels minéraux" est le plus fréquemment utilisé pour la production de périthèces de dermatophytes.

TAKASHIO (1969) s'est attaché à l'étude de certains facteurs nutritifs stimulant la reproduction sexuée chez Arthroderma simii. Cette espèce semble assez tolérante et produit des formes parfaites sur le milieu de Sabouraud qui contient 20 g de glucose et 10 g de néopeptone par litre. Cependant, dans ces conditions les périthèces ne mûrissent pas. TAKASHIO découpe alors après un temps de culture de 1, 2, 3 ou 4 semaines sur le milieu de Sabouraud, un secteur de 180° qu'il dépose sur une nouvelle boîte de Pétri contenant de l'eau gélosée, ou de l'eau gélosée additionnée de sels minéraux. Il obtient ainsi la maturation des périthèces. Pensant que dans les conditions de la transplantation le milieu de culture se dilue, il effectue dans un second temps des croisements de ses souches compatibles directement sur du Sabouraud dilué auquel il ajoute ou non des sels minéraux. Il obtient des périthèces mûrs sur les dilutions au 1/2, 1/4 et 1/8, la meilleure dilution étant celle au 1/4. L'adjonction de sels minéraux augmente le nombre de périthèces produits, surtout pour la dilution au 1/2 où ce nombre passe de 10 à 1100 sur une boîte. Il faut remarquer que les sels minéraux ajoutés au milieu non dilué ne favorisent ni la production, ni la maturation des périthèces. Sur la dilution au 1/2, de nombreux cléistothèces ne mûrissent pas, mais l'auteur n'en indique pas la proportion.

TAKASHIO (1973) a tenté d'appliquer ses résultats intéressants à d'autres espèces de dermatophytes ; Arthroderma benhamiae

produit le plus grand nombre de périthèces mûrs sur Sabouraud 1/8 + sels. Des espèces du complexe Microsporium gypseum, seule Nannizzia incurvata se reproduit sexuellement sur les dilutions du milieu de Sabouraud, et elle semble assez exigeante car TAKASHIO obtient respectivement 0, 417 et 29 périthèces par boîte sur les dilutions 1/2, 1/4 et 1/6. N. gypsea et N. fulva n'ont pas produit de périthèces.

PADHYE, SEKHON et CARMICHAEL (1973) ont publié une étude comparative des milieux "terre plus cheveux humains", "extrait de terre plus cheveux", "farine d'avoine plus sels" de WEITZMAN et coll. et "Sabouraud dilué au 1/4 plus sels" de TAKASHIO. Ils ont testé sur ces milieux les 22 espèces de Nannizzia et d'Arthroderma connues à cette date. Seule N. obtusa est restée stérile sur les différents milieux. Toutes les autres espèces ont produit des périthèces sur terre et extrait de terre plus cheveux. La farine d'avoine plus sels ne convient pas pour N. persicolor, A. cuniculi et A. gloriae. Le milieu de Sabouraud dilué plus sels est le moins favorable de tous et ne permet la fructification sexuée que de N. incurvata, N. grubyia, N. racemosa, A. multifidum, A. benhamiae et A. simii.

Ainsi on est passé d'un milieu de composition très mal définie, la terre, à un milieu semi-synthétique, celui proposé par TAKASHIO, mais ce faisant, on a réduit de 22 à 6 le nombre des espèces capables de fructifier sexuellement. Cela traduit peut-être des exigences nutritives soit plus strictes, soit différentes pour les espèces considérées.

- Facteurs internes, compatibilité des souches :

On ne trouve pas beaucoup de renseignements sur la nature homothallique ou hétérothallique de la plupart des Gymnoascaceae. Le problème ne s'étant pas posé on peut penser qu'elles sont homothalliques. Nous l'avons vérifié pour Arachniotus albicans que nous avons cultivé. Contrairement à cette règle générale, les dermatophytes, à l'exception d'Arthroderma curreyi et les agents de mycoses viscérales dont on connaît la forme sexuée, sont hétérothalliques.

Cet hétérothallisme est un phénomène d'incompatibilité gouverné par un gène avec deux allèles (+ et -), les souches portant le même allèle étant incompatible entre elles ; pour cette raison, ESSER (1965) nomme homogénique ce type d'incompatibilité.

Dans une même espèce de dermatophyte, toutes les souches + ne sont pas fertiles avec toutes les souches -. C'est WEITZMAN (1964) qui, la première, signale cette anomalie chez Nannizzia gypsea. Le même phénomène est observé chez N. cajetani par PADHYE et CARMICHAEL (1971), et chez Arthroderma simii par KWON - CHUNG (1972). Ces incompatibilités seraient du type hétérogénique selon ESSER et BLAICH (1973).

Dans ce système, deux souches, l'une +, l'autre -, portant des allèles différents pour les gènes d'incompatibilité hétérogénique sont soit stériles entre elles, soit fertiles dans un seul sens du croisement (ascogone + fécondable par gamétocyste mâle -, mais pas l'inverse par exemple). Ce type d'incompatibilité a été bien étudié sur le plan génétique par ESSER (1956) chez Podospora anserina.

C'est sans doute aussi à des phénomènes d'incompatibilité hétérogénique que sont dus l'existence et l'isolement de races chez Arthroderma benhamiae décrits par TAKASHIO (1973). Selon cet auteur, il existe chez A. benhamiae, deux races : américano-européenne, et africaine. A l'intérieur de ces deux races, les souches + sont très fertiles avec les souches - de l'autre. De plus TAKASHIO a montré que Trichophyton erinacei est une variété d'A. benhamiae composée de souches qui sont toutes du signe + très compatibles avec les souches - de la race africaine, et quasi-stériles avec celles de la race américano-européenne. TAKASHIO décrit de même une variété "caviae" dont toutes les souches sont de signe -, compatibles avec les souches + de la race américano-européenne. Les variétés "erinacei" et "caviae", bien que de signe opposé, sont stériles entre elles.

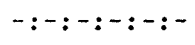
Il est possible de penser que ce sont de tels isolements par incompatibilités qui ont conduit à la formation d'espèces distinctes ;

cela est d'autant plus possible que l'on connaît des complexes d'espèces dont les formes asexuées avaient été confondues comme Microsporium gypseum, Trichophyton terrestre ou T. mentagrophytes.

L'étude de ces incompatibilités présente donc un très grand intérêt, mais complique la recherche d'un milieu de culture favorable à la reproduction sexuée. Réciproquement la possession d'un tel milieu est indispensable pour approfondir notre connaissance des phénomènes d'incompatibilités. Il nous fallait mettre au point le milieu de culture, et nous avons été beaucoup aidé par le fait que TAKASHIO a produit, après plusieurs croisements, deux souches très compatibles d'Arthroderma vanbreuseghemii, il a eu la bienveillance de nous les confier, nous lui adressons nos plus vifs remerciements.

MILIEU DE CULTURE SYNTHETIQUE ET
REPRODUCTION SEXUEE.

Etude chez Arachnietus albicans.



Lorsque nous avons voulu cultiver et obtenir la sexualisation de champignons pathogènes de l'homme, et plus particulièrement de dermatophytes, nous avons rencontré plusieurs difficultés ; dans les conditions habituelles d'entretien des souches, celles-ci vieillissent et perdent progressivement leur pouvoir de se reproduire sexuellement. Ce phénomène aléatoire et particulièrement rapide pour les dermatophytes, rend les résultats difficilement comparables dans le temps. De plus, lors des premiers essais de culture des dermatophytes en milieu synthétique, nous ne récoltions qu'une quantité très faible de mycélium. Nous avons décidé d'entreprendre une étude préalable sur un matériel moins rebelle, et choisi pour cela parmi les Gymnoascaceae saprophytes entretenues dans la collection du laboratoire, l'espèce qui nous semblait la plus favorable. Notre choix s'est arrêté sur Arachnietus albicans Apinis.

MATERIEL ET TECHNIQUES.

La souche d'Arachnietus albicans que nous avons utilisée provient du "Centrallbureau voor Schimmelcultures" de Baarn, Hollande, où elle est inventoriée sous le numéro 151-65.

Les milieux synthétiques ont été réalisés à l'aide de produits purs pour analyse ou pour usages biochimiques manufacturés par la firme Merck, et d'eau bidistillée. Nous avons utilisé de l'eau déminéralisée pour la confection des milieux naturels.

Les milieux solides ont été gélosés à l'aide de 18 g/l de Bacto-agar Difco ; ils ont été coulés en tubes Pyrex de 18 x 180 mm contenant 10 ml de milieu, et inclinés pour la solidification. Les milieux liquides ont été répartis, à raison de 100 ml par fiole, dans des fioles de Roux de 1 litre.

La stérilisation des milieux a été effectuée à partir de cultures en milieu liquide. Le mycélium a été récolté sur papier filtre, lavé abondamment à l'eau déminéralisée, et desséché avec le filtre dans une boîte à tare, à l'étuve à 105°C jusqu'à obtention d'un poids constant.

Toutes les cultures ont été réalisées à 24°C et à l'obscurité.

REPRODUCTION SEXUEE SUR DES MILIEUX DE CULTURE NATUREL ET SEMI-SYNTHETIQUES.

Nous avons cultivé Arachniotus albicans sur un milieu de culture naturel et deux milieux semi-synthétiques qui ont été utilisés par d'autres auteurs pour faire fructifier divers Gymnoascaceae.

- Milieu à base d'avoine :

Dans sa description de l'espèce, APINIS a dit qu'il obtient des périthèces sur "Oat agar". WEITZMAN et SILVA-HUTNER (1967) ont obtenu des formes sexuées de divers dermatophytes sur des milieux contenant de la farine d'avoine. Nous avons préparé un tel milieu dont la composition est la suivante :

- Quaker Oats broyés.....10 g
- Eau.....1000 ml

On porte ce mélange à ébullition pendant 5 minutes, et on laisse ensuite reposer durant une heure. On ajoute alors :

- KH_2PO_41 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$1 g
- NaNO_31 g

Le pH est ajusté à 5,6 et le milieu gélosé à 18 g/l.

Préparé de cette manière ce milieu a la même composition que le milieu E de WEITZMAN et SILVA-HUTNER.

Arachnietus albicans ne produit dans ces conditions qu'un petit nombre de périthèces ; ceux-ci sont néanmoins fertiles.

- Milieu YpSs :

Ce milieu utilisé par ORR, KUEHN et PLUNKETT (1963) pour la production de périthèces de Gymnoascus reessii, a la composition suivante :

- Extrait de levure 4 g
- Amidon soluble.....15 g
- K_2HPO_4 1 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$0,5 g
- Eau 1000 ml

Sur ce milieu, la croissance d'Arachnietus albicans est exubérante et les périthèces ne mûrissent pas ou très tardivement.

TAKASHIO (1969) a montré qu'Arthroderma simii produit sur le milieu de Sabouraud des ébauches de périthèces qui ne mûrissent pas. En diluant ce milieu, il réussit à obtenir cette maturation. Nous avons tenté la dilution du milieu YpSs en espérant un résultat comparable. Le tableau 1 résume nos observations.

Le milieu YpSs, bien que favorable à la reproduction sexuée de certaines espèces de Gymnoascaceae, ne permet pas la maturation des asques d'Arachnietus albicans. Cependant le même milieu dilué au 1/4 permet cette maturation. On remarque, selon la règle, un antagonisme entre la croissance végétative, favorisée sur le milieu non dilué, et la reproduction sexuée. Néanmoins, malgré l'appauvrissement du milieu, à la dilution 1/8, le champignon bien qu'encore capable de croître, ne fructifie plus correctement, ce qui suggère l'apparition de certaines carences.

Tableau 1 : Développement d'Arachniotus albicans sur diverses dilutions du milieu YpSs.

Dilutions	Aspect de la culture à 9 jours	Ebauches de périthèces à 9 jours	Maturation des périthèces à 14 jours
1/1	mycélium aérien sur toute la surface de la colonie	en périphérie de la colonie	pas d'ascospores
1/2	mycélium aérien au centre de la colonie	en périphérie de la colonie	pas d'ascospores
1/4	mycélium dans la gélose. Pas de mycélium aérien	assez abondants sur toute la surface de la colonie	ascospores mûres
1/8	mycélium dans la gélose. Pas de mycélium aérien	rare	pas d'ascospores

- Milieu de Sabouraud dilué :

Nous venons de le dire, TAKASHIO (1969) a étudié la fructification d'Arthroderma simii sur des dilutions du milieu classique de Sabouraud. Le milieu non dilué, qui ne donne que des ébauches immatures, à la composition suivante :

- Glucose pur 20 g
- Néopeptone Difco..... 10 g
- Agar..... 18 g
- Eau 1000 ml

TAKASHIO a également montré qu'après dilution, l'adjonction de sels minéraux favorise la maturation des asques pour les espèces qu'il a cultivées sur ce milieu. Il ajoute, quelque soit la dilution employée :

- KH_2PO_4 1 g/l
- $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/l

Nous avons cultivé Arachnietus albicans sur le milieu de Sabouraud non dilué, et dilué au 1/2, 1/4 et 1/10. Les milieux ont été réalisés sans et avec sels minéraux.

Sur ces huit variations du milieu de Sabouraud, Arachnietus albicans se développe, mais ne produit ni ébauches, ni périthèces mûrs après 14, et même 21 jours de culture.

Nous avons noté que sur les milieux sans sels minéraux, un abondant mycélium aérien est produit, sauf pour la dilution au 1/10 pour laquelle le mycélium aérien se réduit à une touffe floconneuse au centre de la colonie. L'adjonction de sels minéraux modifie profondément la morphologie macroscopique de la colonie. Il n'y a plus de mycélium aérien quelque soit la dilution. Les colonies sont plissées radialement sauf pour la dilution au 1/10.

Arachnietus albicans peut donc se reproduire in vitro ; à 24°C et à l'obscurité, mais le milieu de Sabouraud, même dilué et complété de sels minéraux, est inefficace pour sexualiser ce champignon ; par contre, le milieu YpSs, favorable pour d'autres Gymnoascaceae, doit être dilué pour permettre la maturation des asques d'Arachnietus albicans. Le milieu à base d'avoine, tel que nous l'avons préparé est moins propice que le "Oat sugar" utilisé par APINIS, qui n'en donne pas la composition. Cet auteur s'est contenté de publier une photographie montrant de nombreux périthèces sur ce milieu.

Afin de préciser les exigences nutritives de la reproduction sexuée, nous avons cultivé A. albicans sur des milieux synthétiques dont la composition est parfaitement connue, et peut être modifiée selon les besoins.

REPRODUCTION SEXUEE SUR DES MILIEUX DE CULTURE SYNTHETIQUES.

Les milieux de culture que nous avons étudiés sont constitués :

- d'un milieu minéral ;
- d'une source de carbone ;
- d'une source d'azote
- de facteurs de croissance.

Après comparaison des milieux minéraux proposés par différents auteurs, en particulier LACOSTE (1965) pour les Leptosphaeria et Mc VEIGH et MORTON (1965) pour les Histoplasma, ainsi que ceux cités par COCHRANE (1958), nous avons retenu la composition minérale suivante :

- KH_2PO_4 1,5 g/l
- $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l
- $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ 0,15 g/l
- $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 0,020 g/l
- $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ 0,015 g/l
- $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ 0,010 g/l

Arachniotus albicans n'exige pas de facteurs de croissance pour son développement ; nous avons cependant fourni dans nos milieux 100 µg/l de thiamine et 5 µg/l de biotine. Ces vitamines ont une action sur la reproduction sexuée de nombreux champignons, et c'est pourquoi nous les avons fournies.

Le pH de tous les milieux est amené à 5,6 avant autoclavage à l'aide d'une solution normale de NaOH.

Nous avons réalisé nos essais en choisissant d'abord une source de carbone, puis une source d'azote ; enfin nous avons fait varier les concentrations de ces deux sources en observant les résultats obtenus sur la reproduction sexuée. Nous avons complété cette étude par l'influence du pH sur la croissance et la reproduction.

- Choix d'une source de carbone :

Dans cette expérience nous avons fourni l'azote sous forme de glycocolle. La concentration d'azote retenue étant 100 mg/l ce qui

correspond environ à la concentration en azote du milieu YpSs dilué au 1/4. La source de carbone est fournie aux concentrations de 2, 4 et 8 g/l. Le tableau 2 indique les résultats après 14 jours de culture.

Tableau 2 : Influence de la nature et de la concentration de la source de carbone sur la reproduction sexuée d'Arachniotus albicans au 14^{ème} jour.

concentration source de carbone	2 g/l	4 g/l	8 g/l
glucose	P	E	O
maltose	P	P	O
amidon soluble	quelques E	quelques E	quelques E
fructose	P	E	O

Légende : P = périthèces mûrs - E = ébauches de périthèces (pas d'ascospores mûres) - O = sexualisation nulle.

Dans ces conditions, les concentrations de 8 g/l et plus de sucre ne sont pas favorables à la reproduction sexuée sauf pour l'amidon soluble qui doit être hydrolysé au fur et à mesure, la concentration en sucre directement utilisable restant faible. LACOSTE (1965) observe le même phénomène chez les Leptosphaeria qu'il étudie.

Nous avons retenu le maltose qui donne des périthèces mûrs en 14 jours pour deux des concentrations essayées.

- Choix d'une source d'azote :

100 mg N/l ont été fournis par diverses sources : KNO_3 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, le glycolle, la sérine, l'asparagine et l'arginine, la source de carbone étant du maltose à raison de 2 g/l.

Dans ces conditions, les sources d'azote minéral ont permis la croissance du champignon mais non la production de périthèces ni d'ébauches à 14 jours. Les acides aminés par contre, permettent la reproduction sexuée et il y a peu de différence entre ces milieux. Nous avons donc choisi l'acide aminé le plus simple, soit le glycolle, pour la suite des expériences.

- Influence de l'équilibre C/N et de la concentration en C et N :

Dans cette expérience la source de carbone est représentée par du maltose, les concentrations retenues étant 0,5 g/l, 1, 2, 4 et 8 g/l. L'azote est fourni aux concentrations de 25, 50, 100, 200 et 400 mg/l par du glycolle.

Dans le tableau 3, nous indiquons le temps nécessaire à l'apparition des couples de filaments sexuels, que nous appelons ébauches, et le temps nécessaire à la maturation des périthèces caractérisés par la présence d'ascospores mûres ; les tubes de culture sont conservés à l'obscurité et chaque jour nous observons un lot de tubes correspondant à chaque milieu. L'expérience est arrêtée à 14 jours.

Tableau 3 : *Reproduction sexuée d'Arachniotus albicans en fonction de la concentration en glycolle et en maltose.*

Maltose (g/l)	Glycolle (mg N/l)				
	25	50	100	200	400
0,5	10 -	9 13	8 13	10 13	- -
1	10 -	9 13	8 11	9 13	- -
2	- -	10 14	8 11	8 13	9 -
4	- -	- -	10 13	10 14	8 -
8	- -	- -	- -	10 -	10 -

Légende : 1 : date d'apparition des ébauches de périthèces ; nombre supérieur de chaque case.

2 : date de maturation des périthèces ; nombre inférieur de chaque case.

3 : le signe (-) indique l'absence d'ébauches ou de périthèces au 14e jour.

Nous remarquons que les milieux placés sur une même ligne diagonale descendante ont le même équilibre C/N. Les résultats ont tendance à se placer selon de telles lignes ce qui montre que l'équilibre C/N joue un rôle dans la reproduction sexuée d'Arachniotus albicans. La concentration du milieu joue un rôle également : les milieux trop concentrés (8 g maltose/l - 400 mg N/l par exemple) fournissent un abondant mycélium aérien mais restent capables de former des ébauches de périthèces tandis que les milieux mal équilibrés avec par exemple 8 g/l de maltose mais une concentration d'azote inférieure ou égale à 100 mg/l, ne fournissent plus d'ébauches. Depuis les travaux des auteurs du début du siècle, KLEBS en particulier, il est commun d'affirmer que la reproduction sexuée se produit sur des milieux pauvres. Comme nous l'avons mis en évidence en diluant le milieu YpSs, nous observons également ici que les milieux trop concentrés ne permettent pas la reproduction sexuée, mais il peut en être de même d'un milieu plus dilué si l'équilibre nécessaire entre les différents constituants n'est pas respecté. Ainsi, d'après le tableau 3, si on dilue un milieu contenant 100 mg d'azote pour 8 g de maltose par litre, on n'obtiendra pas de périthèces, ni même d'ébauches. Par contre, en diluant le milieu contenant 200 mg d'azote pour 8 g de maltose, sur lequel les ébauches ne mûrissent pas en 14 jours, on obtiendrait cette maturation pour les dilutions au 1/2 et 1/4, et la dilution au 1/8 ne permettrait de nouveau plus la maturation. Cela est à indiquer au conditionnel, car le tableau 3 correspond à la dilution des seules quantités de maltose et d'azote, le milieu minéral et les vitamines n'étant pas dilués.

Il faut noter également que le milieu de Sabouraud dilué au 1/10 contient 2 g de glucose par litre pour 140 mg d'azote ; le rapport carbone/azote devrait permettre la reproduction sexuée. Il n'en est rien, nous l'avons vu. Il est possible, et sans doute probable, qu'avec le glucose comme source de carbone l'équilibre doit être ajusté avec plus de précision. On peut également penser qu'un ion indispensable ou une vitamine soit en quantité insuffisante dans le milieu de Sabouraud dilué.

Le respect d'un équilibre convenable entre le carbone et l'azote n'est sans doute pas une condition suffisante pour obtenir des périthèces mûrs d'Arachniotus albicans, mais il semble que ce soit une condition nécessaire.

Dans son travail sur Nectria galligena, DEHORTER (1972) a trouvé lui aussi que l'induction sexuelle était sous la dépendance d'un rapport C/N convenable, les quantités absolues de carbone et d'azote pouvant varier entre certaines limites ; des quantités de carbone trouvées inhibitrices dans des travaux antérieurs, ne le sont pas si une dose correcte d'azote leur est associée.

- Influence du pH :

LOCKWOOD (1937) a montré que chez certains champignons (Penicillium javanicum, Aspergillus herboriorum, Chaetomium globosum) cultivés en milieu tamponné, les périthèces peuvent se former dans une large gamme de pH, mais les asques ne mûrissent qu'à pH neutre ou faiblement alcalin.

WEITZMAN et SILVA-HUTNER (1967) cultivent diverses Gymnoascaceae sur des milieux à base d'avoine et observent qu'Arthroderma benhamiae forme des périthèces sur un milieu contenant de la farine d'avoine et des sels minéraux mais non sur ce même milieu dépourvu de sels. Ces auteurs pensent que le pH du milieu contenant uniquement l'avoine serait devenu trop alcalin au cours du développement fongique et aurait empêché la fructification sexuée du champignon.

Nous avons donc cultivé A. albicans sur des milieux comprenant du maltose (2 g/l), du glyco-colle (100 mg N/l), de la thiamine (100 µg/l), de la biotine (5 µg/l) et le milieu minéral précédemment défini mais dont les 1,5 g/l de KH_2PO_4 ont été remplacés par un équilibre de KH_2PO_4 et de Na_2HPO_4 . De cette manière nous pouvons ajuster le pH du milieu à différentes valeurs. Le tableau 4 indique les pH obtenus en fonction des concentrations respectives des deux phosphates. La concentration en ions PO_4^{--} de ces milieux est la même et correspond à 1,5 g/l de KH_2PO_4 .

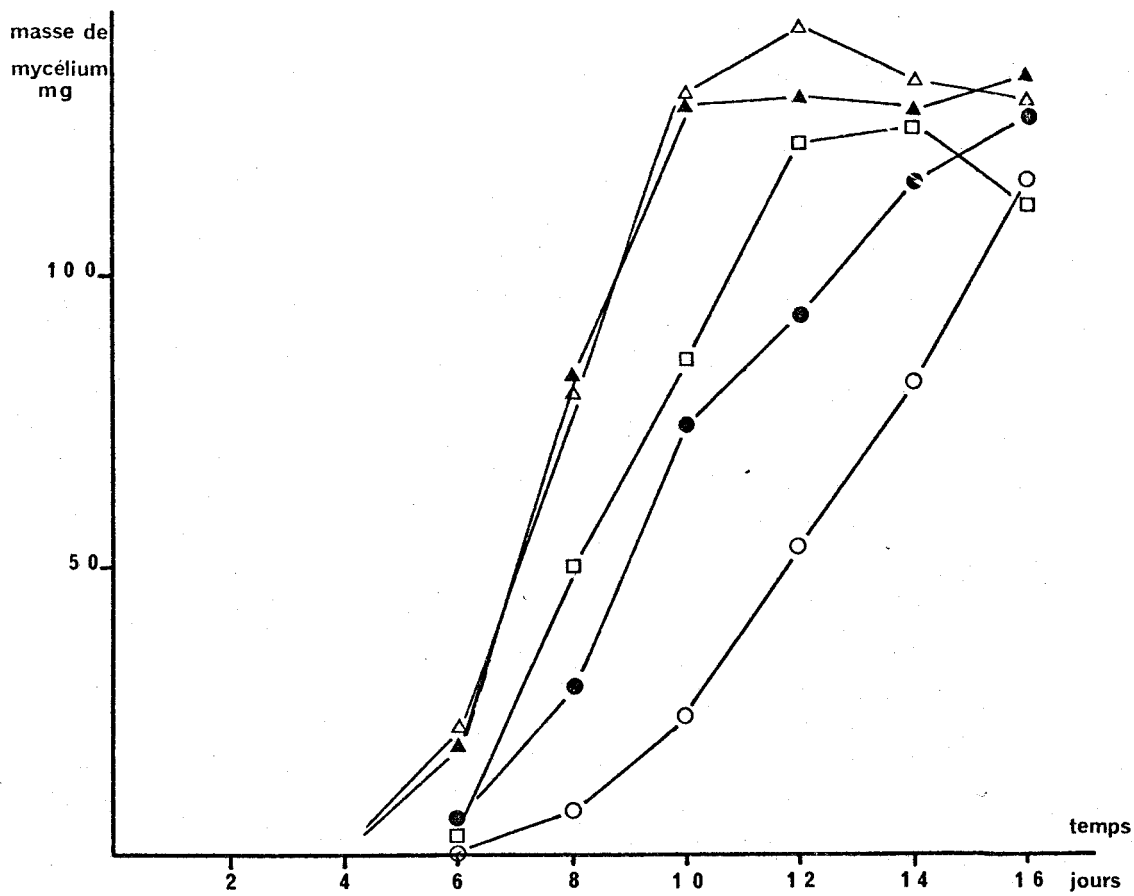
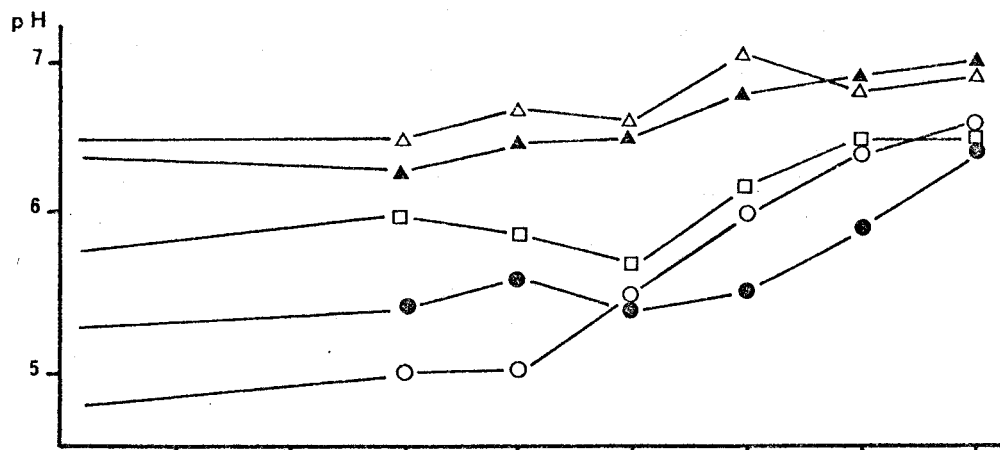
Tableau 4 : pH des milieux de culture avant et après autoclavage en fonction de l'équilibre en KH_2PO_4 et Na_2HPO_4

pH théorique du tampon	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
$[\text{KH}_2\text{PO}_4] \times \text{M}/9.10^4$	990	960	880	675	385
$[\text{Na}_2\text{HPO}_4] \times \text{M}/9.10^4$	10	40	120	325	615
pH du milieu avant autoclavage	5,1	5,5	6,0	6,5	6,8
pH du milieu après autoclavage	4,8	5,3	5,8	6,4	6,5

La figure 2 montre les résultats de cette expérience ; l'amplitude de variation de pH au cours de la culture diminue lorsque le pH de départ augmente. Elle est faible (0,5 unité de pH) lorsque le pH de départ est 6,5 (tampon pH 7,0), elle est assez importante (1,8 unité de pH) pour un pH initial de 4,8 (tampon pH 5,0).

La croissance est plus rapide lorsque le pH initial augmente de 4,8 à 6,5 ; il semble y avoir peu de différence en ce qui concerne la masse maximale de mycélium fournie aux différents pH, bien que pour les pH 4,8 et 5,3 nous ne connaissions pas exactement cette masse, le développement maximal ne semblant pas avoir été atteint au 16ème jour de culture. Sur ces mêmes milieux gélosés, nous avons obtenu les ébauches de périthèces à 9 jours pour les pH 5,3 ; 5,8 et 6,4 ; à 10 jours pour les pH 4,8 et 6,5. Les asques étaient mûrs à 12 jours pour les 5 pH différents. Dans tous les cas les périthèces étaient en nombre équivalent.

Il semble donc que pour Arachniotus albicans le pH initial du milieu compris entre 5 et 7 ait peu d'influence sur la reproduction

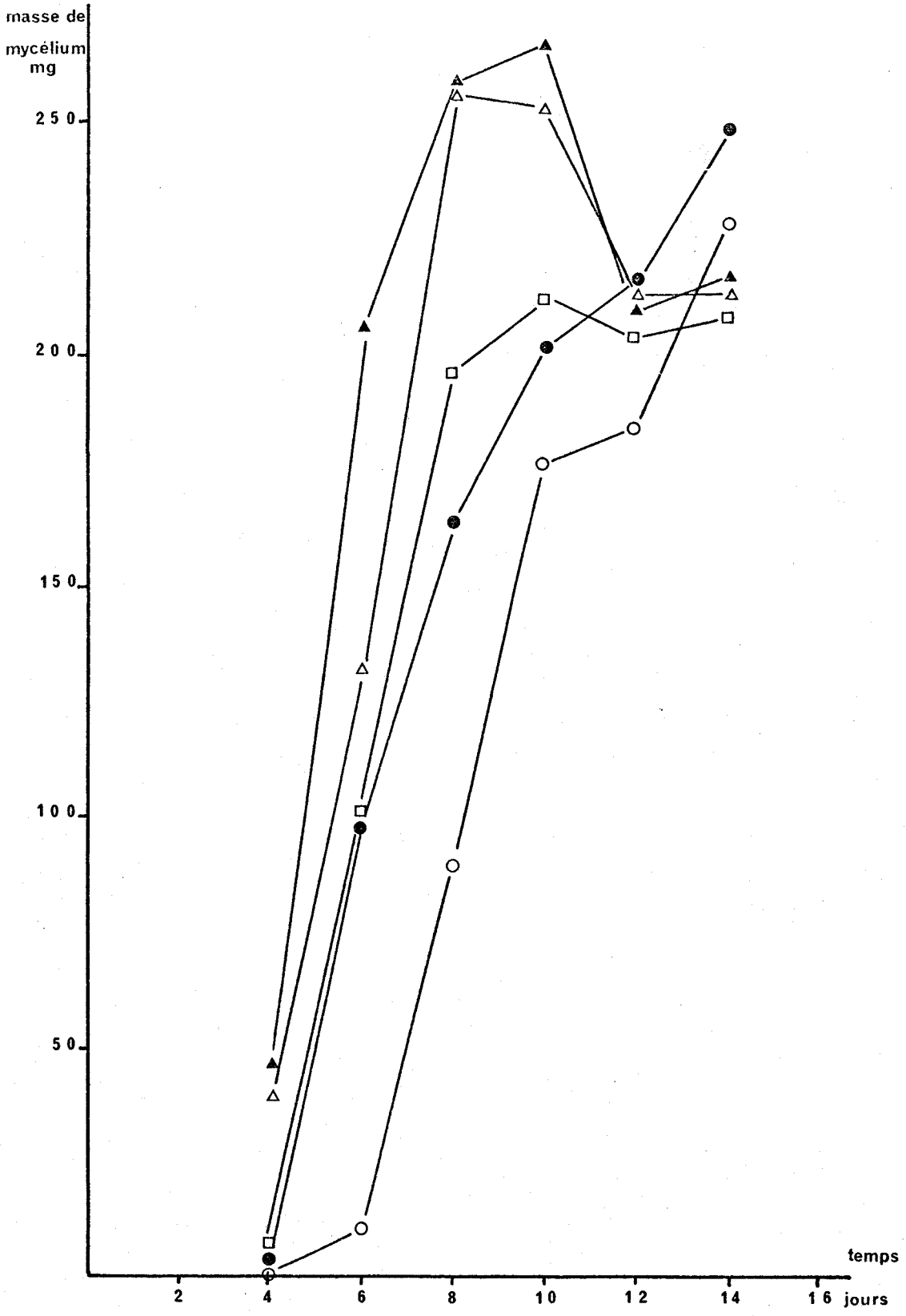
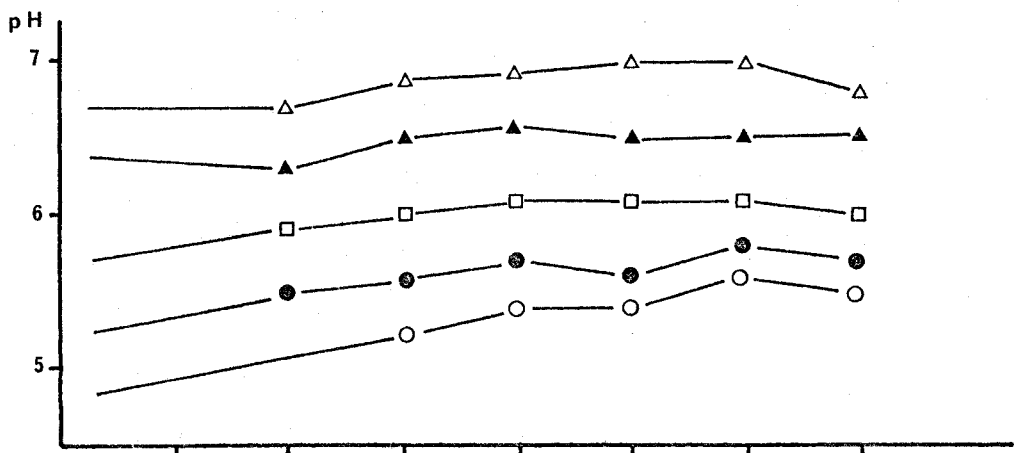


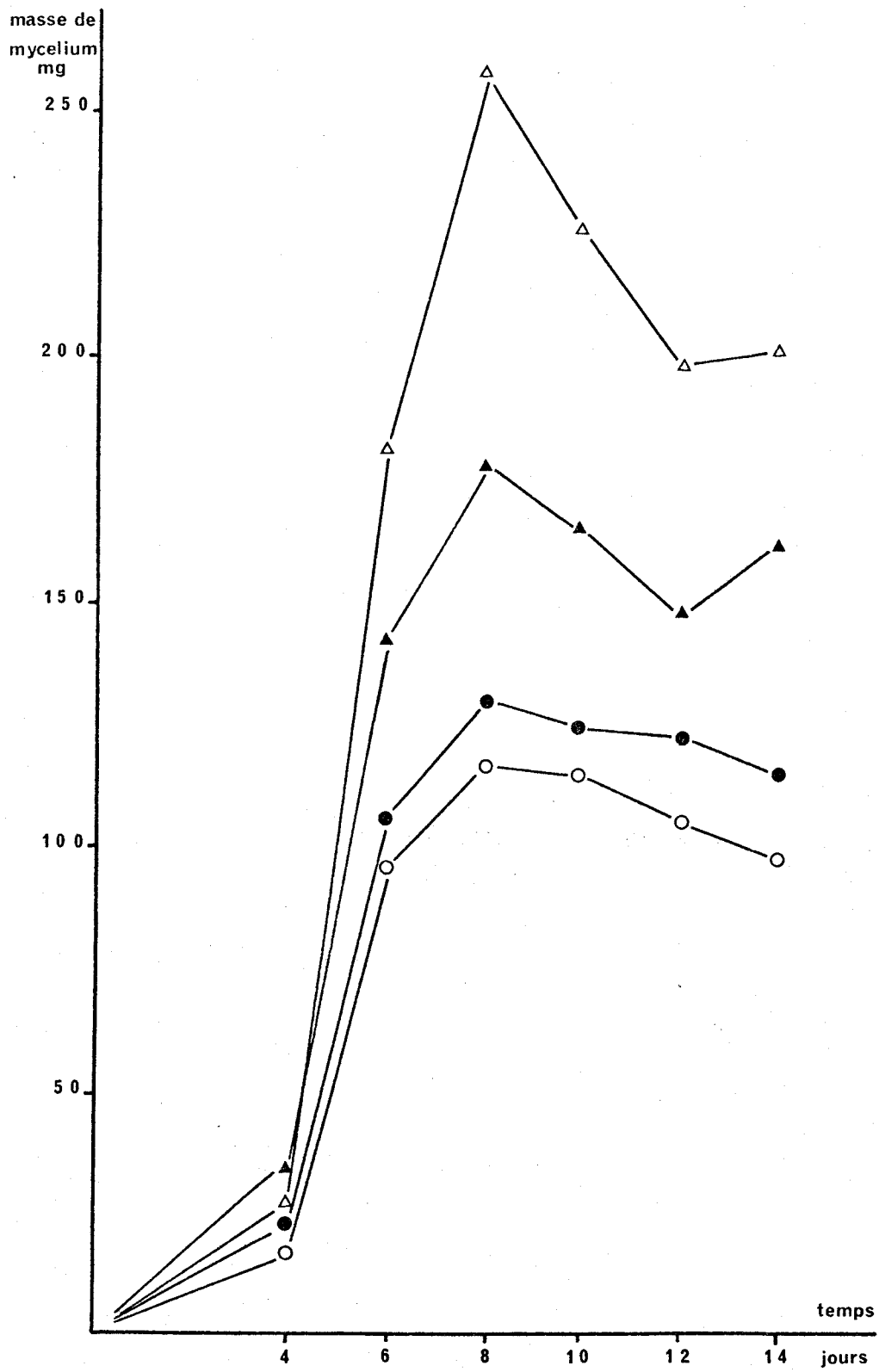
sexuée ; la croissance est cependant plus rapide pour un pH initial de 6,5 que pour un pH plus acide, mais il faut remarquer que le pH du milieu de culture varie davantage dans ce dernier cas. Pour stabiliser davantage le pH, nous avons réalisé des milieux plus fortement tamponnés. Nous avons porté la molarité du tampon phosphate des milieux précédents à M/15, les pH obtenus étaient respectivement 5,1 - 5,6 - 6,0 - 6,5 et 6,8 avant autoclavage et 4,8 - 5,2 - 5,7 - 6,4 et 6,7 après autoclavage. Dans ces conditions les variations de pH sont faibles, les courbes de croissance montrent également une vitesse de développement plus grande lorsque le pH de culture passe de 4,8 à 6,4. La courbe obtenue à pH 6,7 est assez voisine de celle obtenue à pH 6,4, la vitesse de croissance étant un peu plus faible à pH 6,7 (voir figure 3). Il faut remarquer également qu'avec cette concentration en phosphate, les courbes atteignent plus rapidement un maximum beaucoup plus élevé qu'avec une concentration M/90.

La fructification sexuée sur les milieux gélosés correspondants, montre un retard par rapport aux milieux moins tamponnés. Ici les asques ne sont mûrs qu'à 16 jours pour les pH 4,8 ; 5,2 ; 5,7. Au pH 6,4 et 6,7 les ébauches ne contiennent pas encore d'asques à cette date. Les fortes concentrations en phosphate utilisées ici semblent donc être défavorables à la reproduction sexuée alors qu'elles augmentent la croissance ; les courbes de la figure 4 ont été obtenues sur des milieux contenant un tampon phosphate à pH 6,5 à différentes molarités : M/90, M/60, M/30 et M/15. Elles confirment le fait que le maximum de croissance est d'autant plus élevé que le tampon est plus concentré.

- Conclusion :

La composition du milieu de culture joue un rôle important dans la possibilité de reproduction sexuée chez Arachniotus albicans. L'étude d'un milieu synthétique a permis de mettre en évidence le rôle de ses différents éléments. Tout d'abord la nature de sources carbonée et azotée n'est pas indifférente. Le maltose





ou le fructose sont préférables au glucose ou à l'amidon. L'azote minéral ne fournit que du mycélium sans périthèces, les acides aminés testés ayant tous permis la sexualisation du champignon. La reproduction sexuée ne dépend pas des faibles concentrations, ni des concentrations élevées mais d'un équilibre de concentrations convenables. Le choix du pH initial du milieu entre 5 et 7 ne modifie pas la date de maturation des périthèces bien que la croissance soit plus rapide à pH 6,5. La concentration en phosphate qui stimule la croissance lorsqu'elle passe de M/90 à M/15, retarde cette maturation.

Il est donc possible d'élaborer un milieu de culture synthétique permettant d'obtenir régulièrement des périthèces mûrs. Ce milieu permet d'étudier le rôle de chacun de ses composants ; il pouvait également servir de point de départ pour l'étude nutritive d'autres espèces de Gymnoascaceae et en particulier des espèces parasites de l'homme et des animaux.

CROISSANCE ET REPRODUCTION SEXUEE

D'ARTHRODERMA VANBREUSEGHEMI I

-:~::~:~::~:~::~:~::~:~::~:~::~:~::~:-

Le but de notre travail était de proposer un milieu de culture synthétique, dont on pouvait contrôler facilement la concentration des différents éléments, et qui permette d'obtenir régulièrement la fructification sexuée d'un champignon dermatophyte. Les résultats obtenus par TAKASHIO (1969-1973) sur un milieu semi-synthétique et nos propres résultats dans la culture d'Arachniotus albicans nous encourageaient dans cette voie de recherche. Il suffisait de remplacer la néopeptone du milieu de TAKASHIO par une source d'azote de composition chimique connue pour obtenir un milieu synthétique qu'il restait ensuite à améliorer en étudiant l'influence des divers composants sur la reproduction sexuée.

Malheureusement, Arthroderma vanbreuseghemii ne se développait pas ou se développait mal sur les diverses sources d'azote que nous lui avons proposées. Il a donc été nécessaire d'étudier au préalable la croissance en milieu synthétique de cette espèce pour obtenir un développement rapide et important du mycélium, aussi proche que possible de celui obtenu sur néopeptone.

CROISSANCE ET REPRODUCTION SEXUEE SUR LE MILIEU DE SABOURAUD DILUE ET SES MODIFICATIONS.

TAKASHIO (1969 et 1973) a montré que divers dermatophytes, en particulier Arthroderma vanbreuseghemii, se reproduisait sexuellement sur diverses dilutions du milieu de Sabouraud auquel on ajoute des sels minéraux. Cet auteur n'a cependant pas établi

de courbe de croissance des espèces qu'il a étudiées, et il ne précise pas non plus les délais de fructification. Nous avons voulu préciser ces deux points pour pouvoir y comparer les résultats obtenus en milieu synthétique.

- Etude de la croissance d'*Arthroderma vanbreuseghemii*
sur le milieu proposé par TAKASHIO :

La composition du milieu de culture retenu par TAKASHIO pour faire fructifier *A. vanbreuseghemii* a la composition suivante :

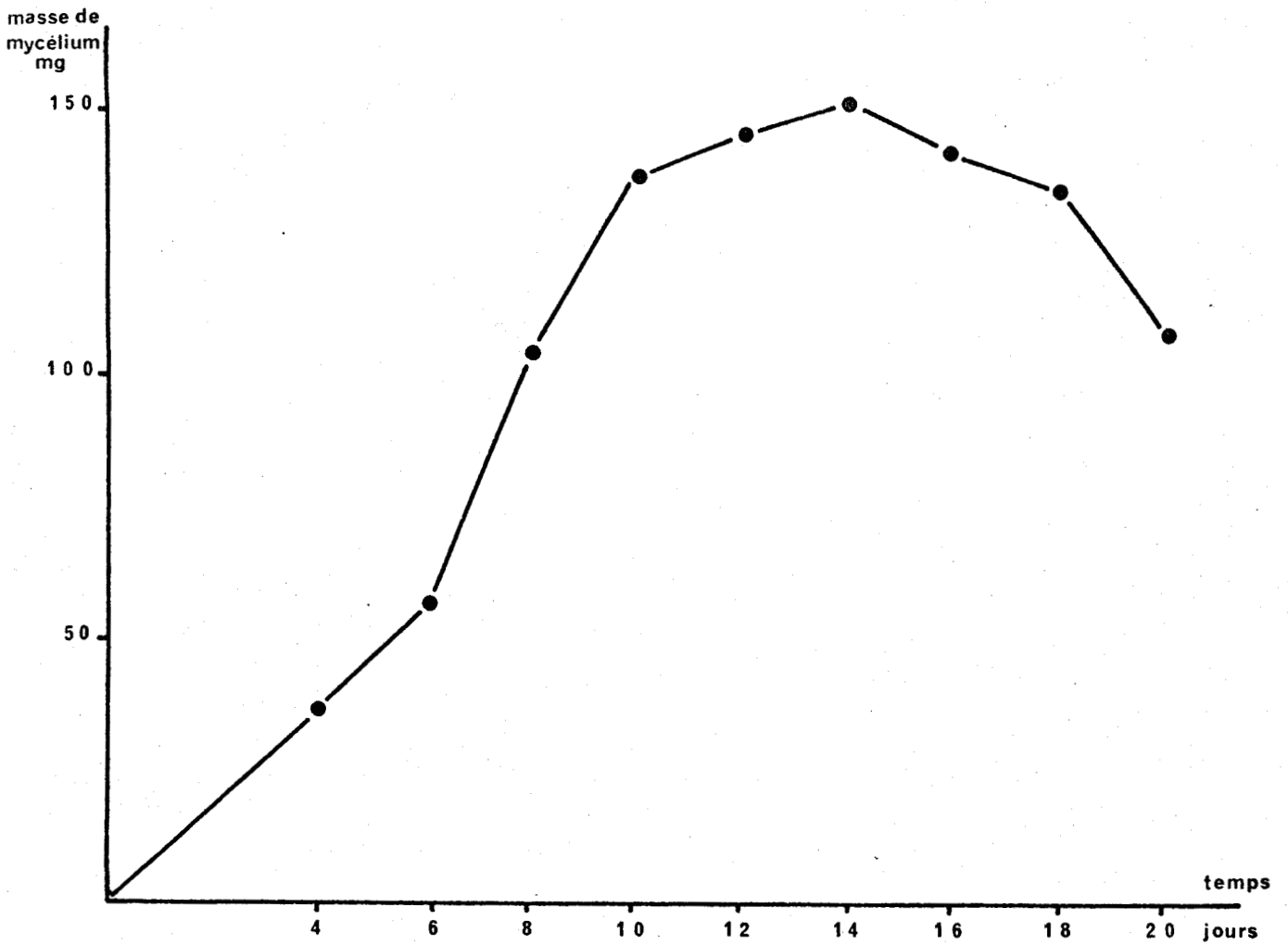
- Glucose pur 2 g
- Néopeptone Difco 1 g
- KH_2PO_4 1 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g
- Agar 20 g
- Eau 1000 ml

La courbe de croissance a été réalisée avec la souche RV 27 960 (qui porte le signe d'incompatibilité +) en fioles de Roux de 1 litre contenant 100 ml de milieu de culture liquide, à 24°C et à l'obscurité. L'ensemencement des fioles est fait à l'aide d'une suspension de spores. Nos résultats sont consignés dans la figure 5.

La reproduction sexuée a été obtenue sur le milieu gélosé en plaçant les explantats des deux souches RV 27 960 et RV 27 961 (qui porte le signe d'incompatibilité -) à 1 cm de distance en boîte de Pétri de 9 cm de diamètre contenant environ 20 ml de milieu. A 24°C et à l'obscurité les périthèces sont formés à la limite des deux colonies et mûrs à 12 jours.

Nous avons essayé également d'employer la méthode préconisée par DEHORTER (1972) pour obtenir la sexualisation en milieu liquide : nous avonsensemencé avec des suspensions de spores des deux souches, 15 ml de milieu de culture non gélosé contenus dans des tubes de Legroux dont le fond est tapissé de 6 baguettes de

Figure 5 : Croissance pondérale d'Arthroderma vanbreuseghemii sur milieu de Sabouraud dilué au 1/10 plus sels minéraux (milieu de Takashio).



verre Pyrex de 6 mm de diamètre. Dans ces conditions, le mycélium se développe à la surface du milieu, maintenu par les baguettes, et reste convenablement aéré. Nous avons de cette manière obtenu des périthèces mûrs après 11 jours de culture.

Cette première série de cultures nous a permis de préciser le maximum de la courbe de croissance : 150 mg à 14 jours et le délai de la reproduction sexuée : les périthèces sont mûrs à 11 - 12 jours. La reproduction a donc bien lieu dans ces conditions pendant la phase de croissance sur le milieu fourni ne contenant encore à ce stade que peu de produit de lyse. Lorsque la reproduction a lieu après le maximum de croissance, elle se produit sur un milieu contenant principalement un autolysat du champignon et donc très différent du milieu initial.

- Modification du milieu de TAKASHIO en vue de remplacer la néopeptone :

La néopeptone représente dans le milieu de culture que nous étudions, la source d'azote. Mais elle fournit également des éléments minéraux et c'est pourquoi TAKASHIO n'apporte que du phosphate monopotassique et du sulfate de magnésium. Si nous supprimons la néopeptone, il faudra apporter un milieu minéral complet, et nous avons choisi celui utilisé précédemment pour Arachniotus albicans.

Il est possible également que la néopeptone contienne des vitamines. Par suite nous avons décidé de fournir un mélange vitaminique dans les milieux de culture synthétiques.

Nous avons vérifié que le mélange de vitamines et le milieu minéral choisis étaient sans effet, ni inhibiteur ni stimulateur sur la croissance et la reproduction sexuée d'Arthroderma vanbreuseghemii, lorsqu'ils sont fournis avec le milieu de Sabouraud dilué au 1/10, en remplacement des deux sels ajoutés par TAKASHIO ; pour cela, nous avons réalisé les milieux suivants :

- Milieu de Sabouraud dilué au 1/10 additionné de sels selon TAKASHIO et additionné également de vitamines ;

- Milieu de Sabouraud dilué au 1/10 additionné du milieu minéral complet et de vitamines.

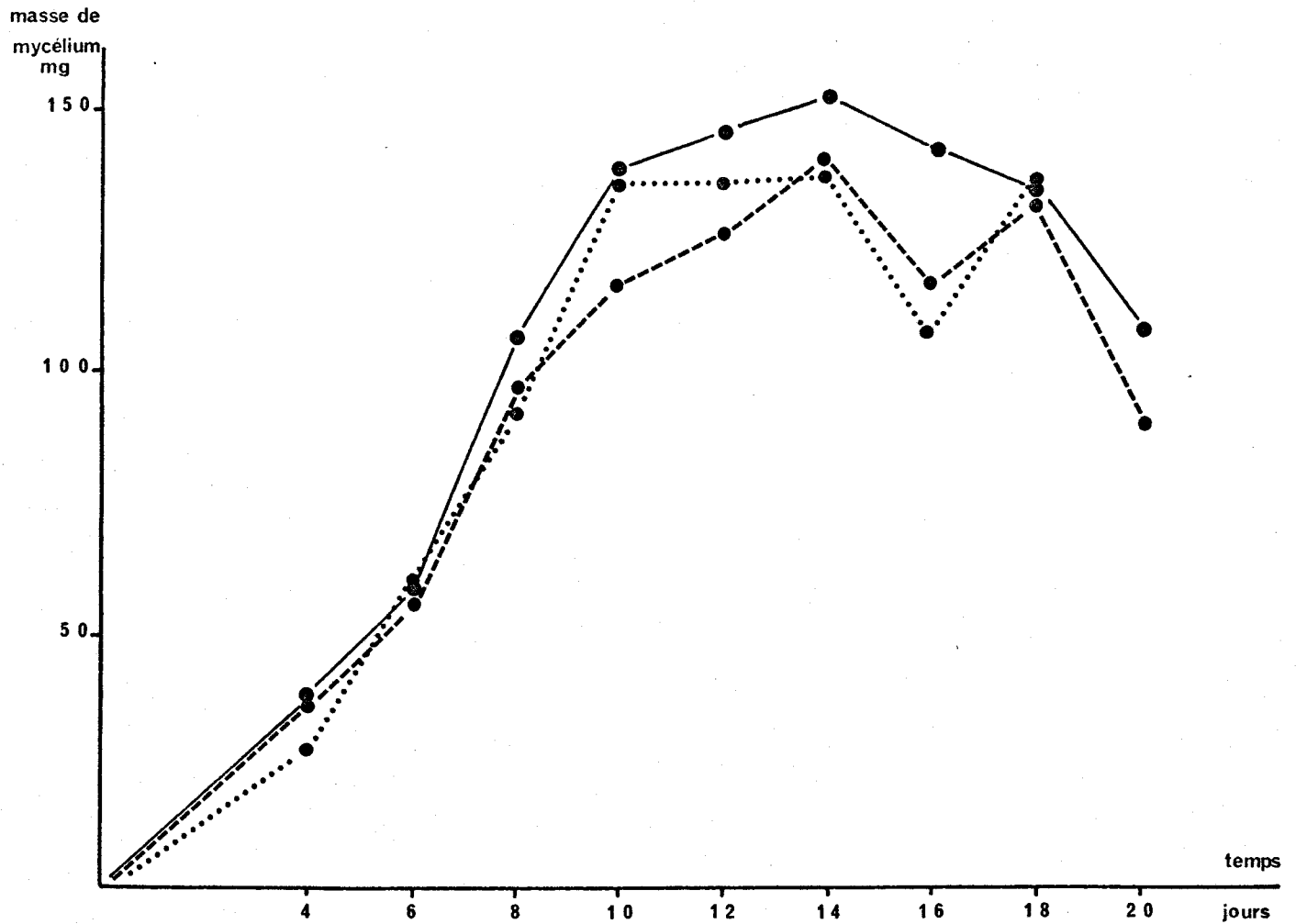
Ce dernier milieu a finalement la composition suivante :

- Glucose..... 2 g/l
- Néopeptone..... 1 g/l
- Milieu minéral :
 - KH_2PO_41,5 g/l
 - $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l
 - $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ 0,150 g/l
 - $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 0,020 g/l
 - $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$0,010 g/l
 - $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$0,015 g/l
- Vitamines :
 - Thiamine.....100 $\mu\text{g}/\text{l}$
 - Biotine..... 5 $\mu\text{g}/\text{l}$
 - Inositol..... 5 mg/l
 - Acide nicotinique.....100 $\mu\text{g}/\text{l}$
 - Pantothénate de Calcium.....200 $\mu\text{g}/\text{l}$
 - Riboflavine.....100 $\mu\text{g}/\text{l}$
 - Pyridoxine hydrochloride.....100 $\mu\text{g}/\text{l}$

Les courbes de croissance obtenues sur ces deux milieux sont comparées dans la figure 6 avec celle que nous avons obtenue sur le milieu de TAKASHIO. On note très peu de différence entre ces trois courbes, sauf peut-être un léger effet inhibiteur en fin de croissance, aussi bien en présence des vitamines seules qu'en présence des vitamines et du milieu minéral.

Sur le milieu de culture complet, en tubes de Legroux munis de baguettes de verre, la reproduction sexuée a lieu dans un délai de 11 jours, identique à celui observé sur le milieu de TAKASHIO.

Figure 6 : Croissance pondérale d'Arthroderma vanbreuseghemii sur des milieux de culture dérivés du Sabouraud dilué au 1/10.



- milieu de Sabouraud dilué au 1/10 + KH_2PO_4 et MgSO_4
- - -●- - - milieu de Sabouraud dilué au 1/10 + KH_2PO_4 et MgSO_4 + vitamines
-●..... milieu de Sabouraud dilué au 1/10 + milieu minéral complet + vitamines.

- Essais de substitution de la néopeptone :

Pour que notre milieu de culture soit de composition chimique définie, il suffit maintenant de remplacer la néopeptone par une source d'azote définie. Un gramme de néopeptone apporte 140 mg d'azote selon le manuel Difco. Nous avons donc fourni dans nos milieux de culture 140 mg d'azote sous différentes formes.

La suppression de la néopeptone nous a également obligé à rectifier le pH de nos milieux de culture avant autoclavage et à les amener à pH = 6,0. En effet, TAKASHIO ne précise pas le pH de son milieu et par conséquent ne le rectifie pas ; c'est ce que nous avons fait précédemment, la néopeptone ayant un certain pouvoir tampon.

Dans les conditions que nous venons de définir, les deux sources d'azote minéral que nous avons fournies, KNO_3 et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ n'ont pas permis la croissance de la souche RV 27 960.

Nous avons aussi essayé les acides aminés de la série L : certains de ces acides aminés : proline, glycofolle, histidine, thréonine, méthionine et valine ne permettent pas non plus la croissance ; tandis que la cystéine et la phénylalanine font se développer un très fin voile mycélien dont il n'a pas été possible d'évaluer la masse.

D'autres acides aminés ont procuré un développement que nous avons mesuré après 12 jours de culture. Pour ceux-ci nous avons également pu observer la reproduction sexuée en milieu liquide dans des tubes de Legroux munis de baguettes de verre ; l'ensemble de ces résultats est indiqué dans le tableau 5 .

Tableau 5 : Croissance et reproduction sexuée d'*Arthroderma vanbreuseghemii* sur des milieux de culture synthétiques contenant un acide aminé pur comme source d'azote.

Acide aminé	Croissance à 12 jours	Présence d'ébauches ou de périthèces à 18 jours	Date de maturation des périthèces
Acide glutamique	60 mg	Pseudopérithèces *	-
Proline	0 mg	- **	-
Arginine	18 mg	Périthèces	12 j.
Acide aspartique	36 mg	Pseudopérithèces	-
Lysine	4 mg	-	-
Thréonine	0 mg	-	-
Isoleucine	5 mg	-	-
Méthionine	0 mg	-	-
Sérine	13 mg	Périthèces	14 j.
Alanine	60 mg	Périthèces	16 j.
Glycocolle	0 mg	-	-
Cystéine	Traces	-	-
Leucine	8 mg	Couples sexuels	-
Valine	0 mg	-	-
Phénylalanine	Traces	-	-
Histidine	Traces	-	-

* Les pseudopérithèces ont l'aspect macroscopique des périthèces, mais ne contiennent ni asques, ni ascospores ; ils sont remplis de microconidies.

** Le signe "-" indique l'absence de périthèces ou d'ébauches après 18 jours de culture.



Nous remarquons d'après ce tableau que les masses de mycélium récupérées sont faibles et tout au plus égales à la moitié de celles que l'on obtient sur néopeptone pour un même temps de culture. Malgré cela, on obtient la reproduction sexuée sur certains acides aminés. Il est remarquable que l'on obtienne des péritèces mûrs à 12 jours sur l'arginine alors que la croissance est très faible.

Les résultats concernant la croissance, sont en accord avec ceux de DROUHET et MARIAT (1952) et DROUHET (1952) qui ont cultivé différents dermatophytes sur des milieux synthétiques gélosés. Ces auteurs n'ont obtenu une bonne croissance que sur les sources d'azote organique. Malheureusement, ils ont utilisé des milieux gélosés et n'ont pas indiqué les masses de mycélium produites sur chaque acide aminé. Nos résultats ne sont cependant pas en accord parfait : Trichophyton mentagrophytes utiliserait selon DROUHET le glycofolle, la proline, la thréonine et la valine. Plusieurs explications peuvent être données :

- la souche de Trichophyton mentagrophytes cultivée par DROUHET n'appartient peut-être pas à l'espèce Arthroderma vanbreuseghemii ;

- les cultures sont faites en milieu gélosé, et l'agar peut contenir des substances qui stimulent la croissance du champignon ;

- les cultures sont observées après un mois de culture à 25°C et non comme les nôtres au bout de 12 jours.

VIDON (1973) note dans sa thèse qu'Arthroderma simii ne se développe pas en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ comme source d'azote. Il croît par contre sur l'alanine, l'acide aspartique, l'asparagine, le glycofolle et la phénylalanine. La cystéine, la méthionine et le tryptophane ne permettent pas la croissance qui est lente en présence de lysine. Ces résultats ont été obtenus en milieu gélosé et la masse de mycélium n'a pas été mesurée. Selon VIDON, l'alanine est la meilleure source d'azote.

Selon Mc VEIGH et CAMPBELL cités par DROUHET (1952), la croissance de Trichophyton mentagrophytes obtenue en présence d'un seul acide aminé n'atteint pas celle que l'on obtient en présence d'un mélange d'acides aminés comme celui qui figure dans l'hydrolysate de caséine. Cette observation est également en accord avec nos mesures et nous avons essayé de cultiver Arthroderma vanbreuseghemii sur divers mélanges d'acides aminés conçus à partir de l'analyse de la néopeptone Difco.

- Croissance sur des mélanges d'acides aminés :

a) néopeptone reconstituée :

.....
Le premier mélange d'acides aminés que nous avons essayé de fournir est aussi le plus complexe. Il s'agit de l'ensemble des amino-acides trouvés dans la néopeptone et fournis dans les proportions révélées par l'analyse du produit*.

En procédant ainsi, on réalise une "peptone synthétique" dont on connaît exactement la composition ; on élimine de la sorte l'apport par la peptone, de sels minéraux et de vitamines que nous n'aurions pas fournis dans les milieux synthétiques.

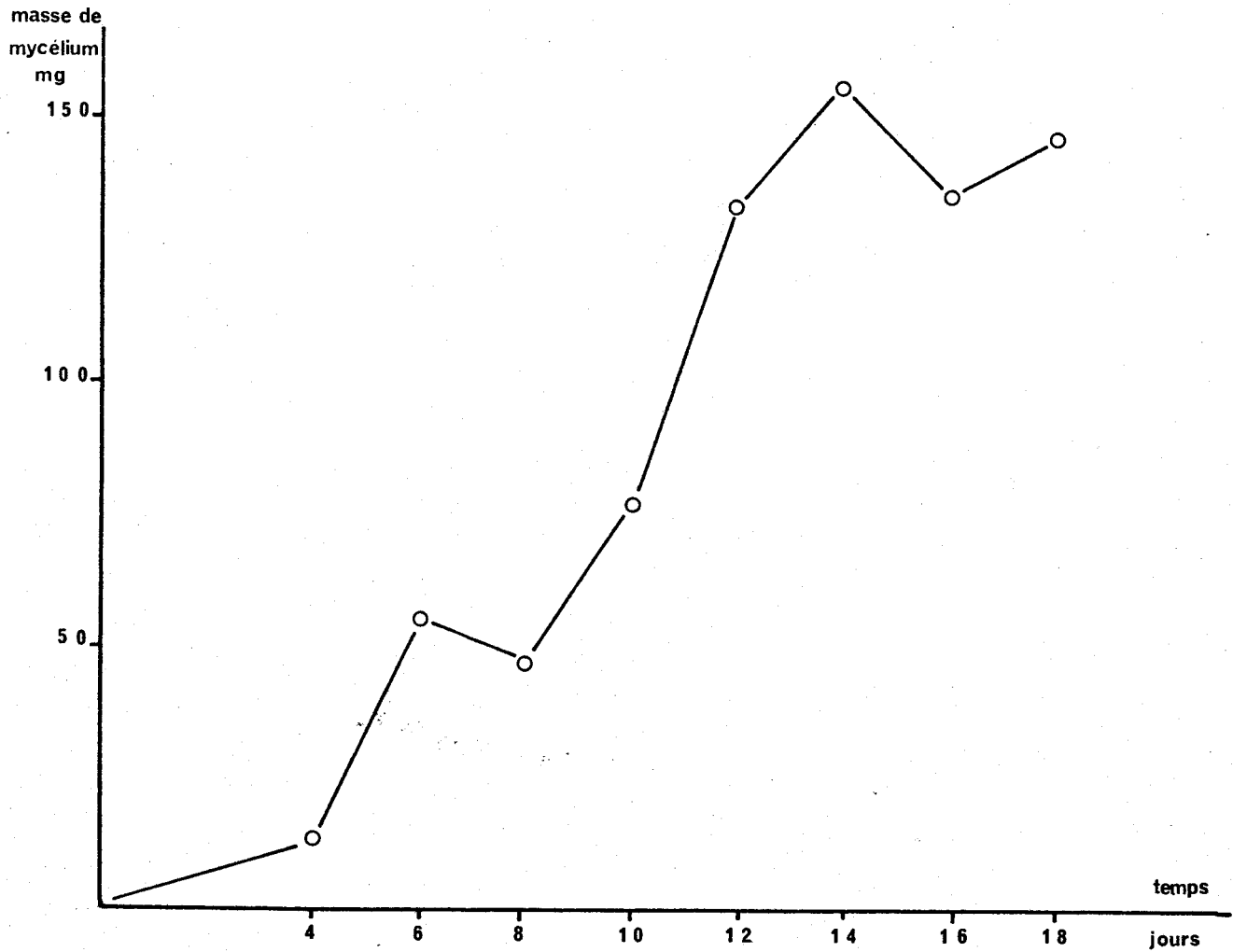
L'analyse après hydrolyse à l'acide chlorhydrique ne permet pas de retrouver le tryptophane qui n'a pas été dosé et n'a pas non plus été fourni. Malgré cette absence de tryptophane la croissance sur ce milieu est aussi rapide et aussi importante que sur celui de TAKASHIO ; le maximum de croissance est atteint à 14 jours avec 150 mg de mycélium (figure 7).

b) mélanges de 5 ou 6 acides aminés :

.....
Nous avons essayé de simplifier le mélange constitué par la néopeptone en ne tenant compte que des 6 acides aminés qui apportent la plus grande quantité d'azote, soit pour l'ensemble des 6 acides aminés 58 % de l'azote contenu dans la néopeptone ; ces 6 acides aminés sont l'acide glutamique, l'arginine, la lysine, la proline, le glyco-colle, la leucine.

* Cette analyse a été réalisée par M. RUFFIN que nous remercions très sincèrement.

Figure 7 : Croissance d'Arthroderma vanbreuseghemii en présence d'un mélange d'acides aminés reconstituant la néopectone.



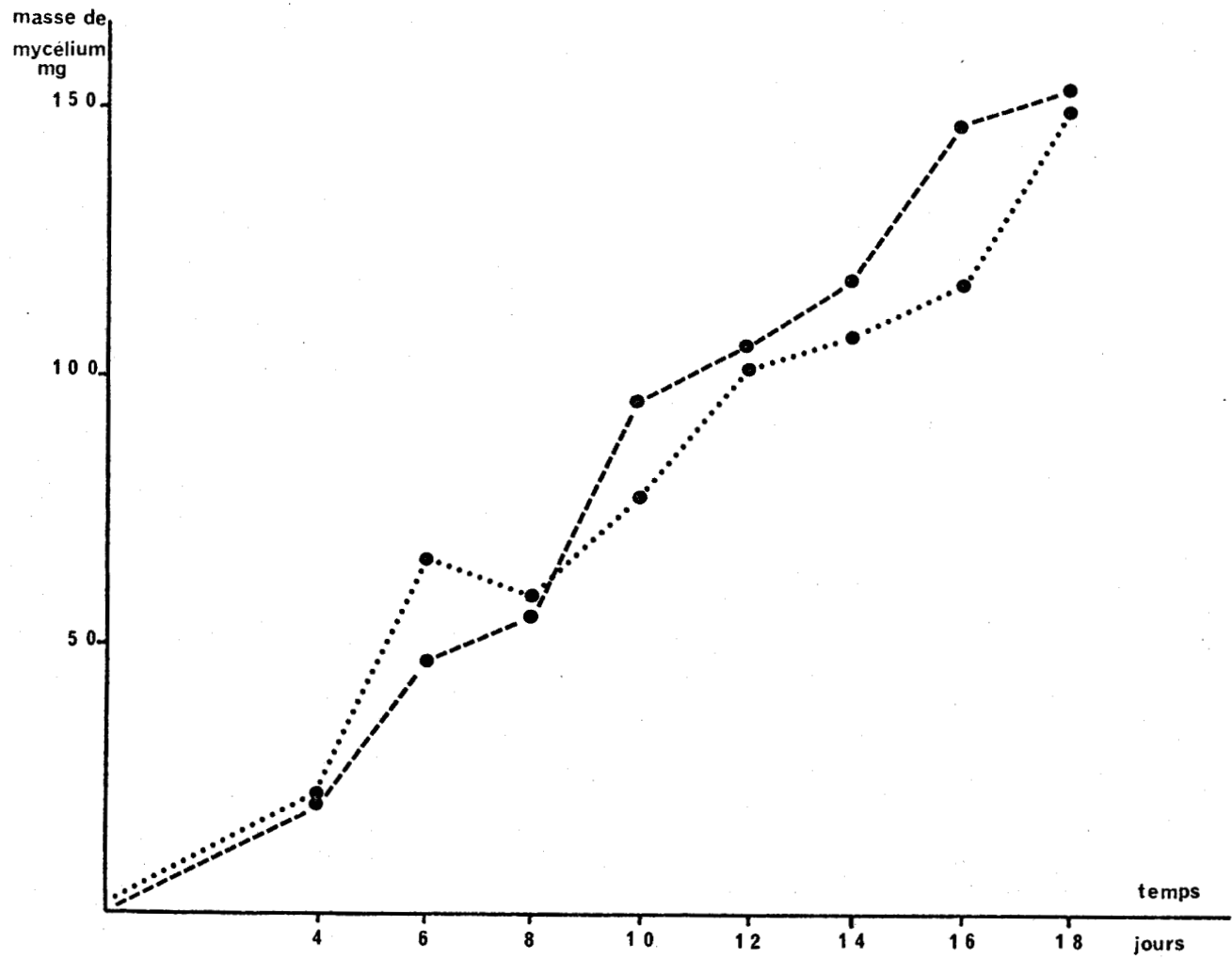
Dans cet essai, chaque acide aminé apporte la même quantité d'azote soit 23 mg. Sur ce mélange, la croissance qui est d'abord voisine de celle obtenue sur néopeptone reconstituée se ralentit ensuite et le maximum n'est pas encore atteint à 18 jours.

Dans un autre essai, nous avons fourni l'acide glutamique, l'arginine, la proline, la leucine et la sérine soit 5 acides aminés apportant chacun 28 mg d'azote. Les résultats sont assez semblables à ceux obtenus avec le mélange de 6 acides aminés ; la croissance qui est bonne dans l'ensemble, présente un certain retard par rapport à la néopeptone reconstituée après le 14^{ème} jour. Nous obtenons cependant 150 mg de mycélium sec (figure 8).

Ainsi, il se vérifie que la croissance est meilleure sur un mélange d'acides aminés que sur un seul. Il semble que l'apport de 140 mg d'azote permette la production de 150 mg de mycélium sec, dans les conditions de culture adoptées. Nous avons essayé de simplifier la source d'azote, et de faire croître Arthroderma vanbreuseghemii sur divers mélanges de deux acides aminés en mesurant la masse de mycélium sec récolté après 12 jours de culture. De cette manière nous n'avons jamais obtenu une quantité de mycélium égale à celle fournie dans le même temps par la néopeptone ou la néopeptone reconstituée. Une mesure unique au 12^{ème} jour est insuffisante car on ne peut savoir si le résultat faible est dû à un temps de latence important, ou bien à une vitesse de croissance faible. Nous avons alors décidé d'abandonner la mesure unique pour étudier des courbes de croissance complètes. Cette méthode a l'inconvénient d'être fastidieuse, mais c'est la seule qui permette de comparer les résultats. Nous nous sommes aussi attaché à fournir les acides aminés en fonction des voies métaboliques dans lesquels ils interviennent.

Avant de présenter le résultat de notre travail sur la nutrition azotée d'A. vanbreuseghemii, nous examinerons les voies de synthèse des acides aminés.

Figure 8 : Croissance d'Arthroderma vanbreuseghemii sur des milieux de culture synthétiques, renfermant différents mélanges d'acides aminés comme source d'azote.



.....●..... mélange d'acide glutamique, proline, glycolle, leucine, arginine et lysine.

-----●----- mélange d'acide glutamique, proline, leucine, arginine et sérine.

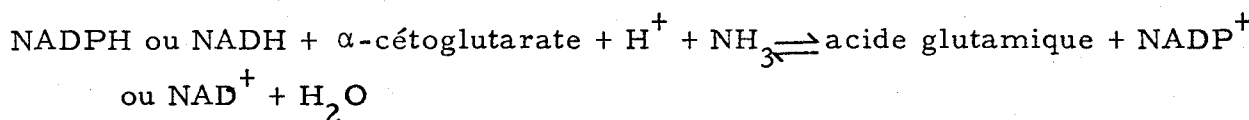


SOURCE AZOTEE ET CROISSANCE.

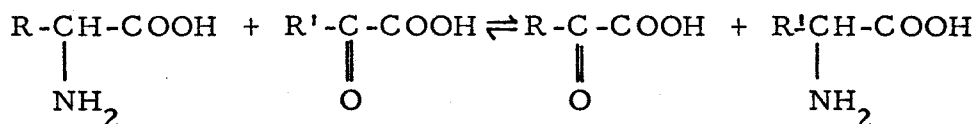
- Voies de synthèse des acides aminés :

Ce paragraphe a été rédigé en consultant principalement les ouvrages de BERNFELD (1963), de ESSER et KUENEN (1967) et de AUBERT et Coll. (1974).

Chez les microorganismes capables d'utiliser l'azote minéral, le premier acide aminé synthétisé est l'acide glutamique, selon la réaction :

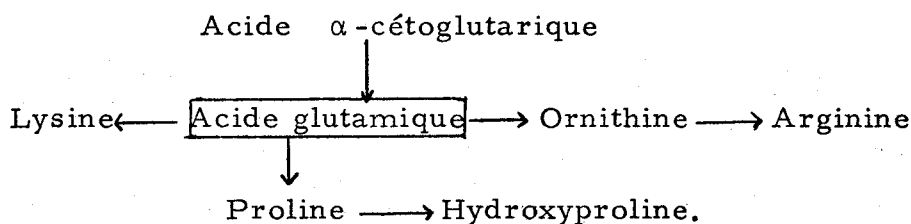


L'enzyme qui catalyse la réaction est une déshydrogénase glutamique. Le groupe aminé de l'acide glutamique peut être ensuite transféré sur diverses chaînes carbonées par transamination :

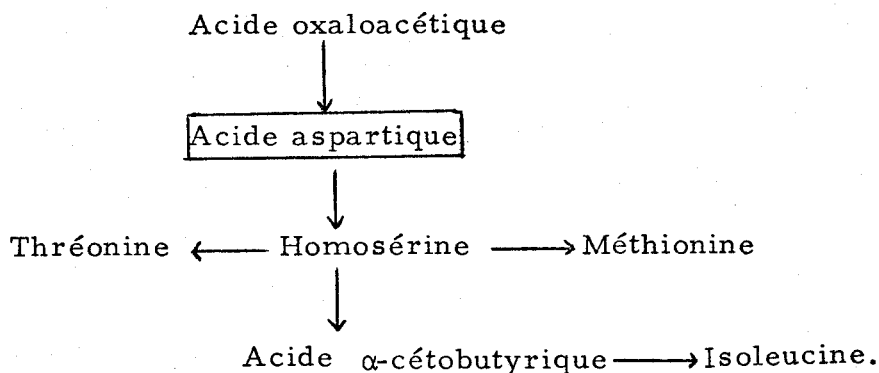


le cofacteur indispensable de cette réaction est le phosphate de pyridoxal. Selon la nature du chaînon carboné, on distingue plusieurs familles d'acides aminés :

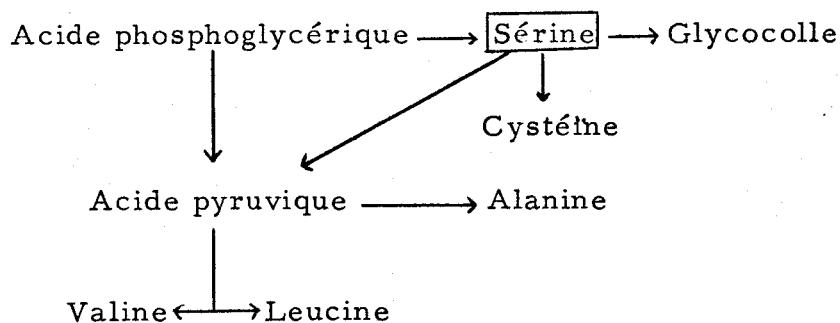
- la famille de l'acide α -cétoglutarique dont le chef de file est l'acide glutamique ; en négligeant les intermédiaires, on peut écrire :



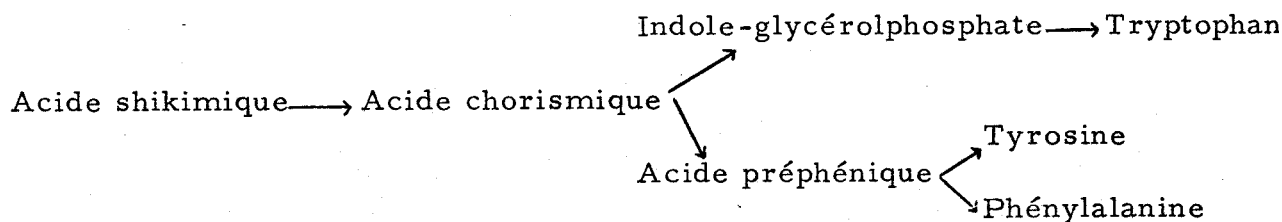
- la famille de l'acide oxaloacétique dont le chef de file est l'acide aspartique :



- la famille des acides phosphoglycérique et pyruvique dont le chef de file est la sérine :



- la famille des acides aminés aromatiques :



- l'histidine, enfin, est synthétisée par une voie particulière à partir d'un pentose.

En tenant compte de ces schémas de synthèse, nous avons décidé d'étudier la croissance d'Arthroderma vanbreuseghemii d'abord sur les acides glutamique et aspartique et la sérine qui doivent couvrir la plus grande partie des besoins en azote du champignon, les acides aminés aromatiques et l'histidine se trouvant généralement en petite quantité dans les protéines. En agissant ainsi, nous formulons l'hypothèse qu'Arthroderma vanbreuseghemii

n'était affecté d'aucune déficience grave, et s'avérait capable de synthétiser tous les acides aminés, mais seulement à une vitesse faible, faute par exemple de transaminer correctement, ou à cause d'un manque d'acides α -cétoniques transaminables en quantité suffisante.

- Croissance sur les acides glutamique et aspartique et la sérine :

Nous avons établi 5 courbes de croissance sur des milieux contenant le milieu minéral, 2 g/l de glucose, les vitamines citées précédemment, et 140 mg d'azote par litre fournis par :

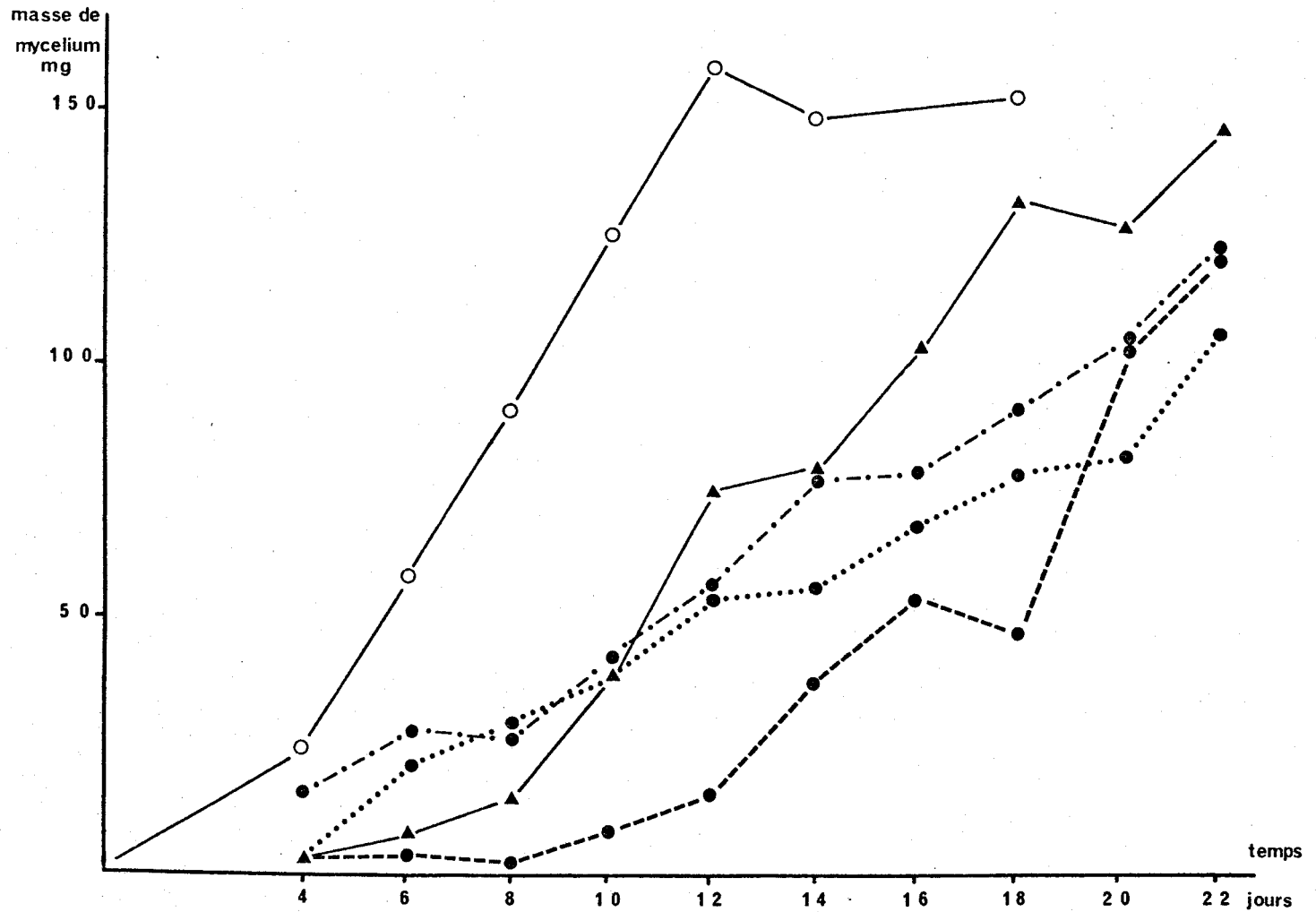
- soit - de l'acide glutamique
- de l'acide aspartique
- de la sérine
- un mélange de ces trois acides aminés, chacun apportant 47 mg N/l
- de la néopeptone, pour obtenir une courbe témoin.

Ces courbes sont tracées sur la figure 9.

Nous remarquons tout d'abord qu'Arthroderma vanbreuseghemii est capable de croître sur chacun des acides aminés fournis séparément. Il est donc capable de synthétiser les squelettes carbonés de tous les acides aminés, et d'effectuer les transaminations avec comme donneur l'un des trois acides glutamique, aspartique ou sérine. Notons qu'il peut aussi utiliser comme donneur l'alanine et moins facilement l'arginine, puisque nous l'avons vu, nous obtenons une croissance avec ces sources d'azote.

Cependant, les accroissements pondéraux journaliers sont relativement faibles : la vitesse moyenne mesurée pendant la phase de croissance, soit entre 4 et 22 jours pour les acides glutamique et aspartique est de 5,7 mg par jour, alors que pour la néopeptone entre 4 et 12 jours, cette vitesse est de 16,6 mg par jour, soit trois fois plus. La sérine permet une vitesse de croissance plus rapide : 8,2 mg par jour entre 8 et 22 jours, mais le temps de latence est beaucoup plus long avec cet acide aminé.

Figure 9 : Croissance d'Arthroderma vanbreuseghemii sur des milieux de culture renfermant 140 mg d'azote/l fourni sous différentes conditions.



Nature de la source d'azote :

- Néopeptone Difco
- ▲— mélange d'acides glutamique et aspartique et de sérine (47 mg N/l chacun)
-●..... acide glutamique
-●..... acide aspartique
- .-.-●-.-.- sérine.



Sur le mélange des trois acides aminés, la vitesse de croissance est à peu près celle obtenue avec la sérine, soit 8 mg par jour, et le temps de latence intermédiaire entre celui que l'on observe sur les acides glutamique ou aspartique et la sérine utilisés isolément. Mais nous sommes encore loin de la courbe obtenue sur néopeptone : un temps de latence plus long et une vitesse de croissance deux fois plus faible apportent un retard de 10 jours au moment du maximum de la courbe. Notons cependant que ce maximum est de l'ordre de 150 mg avec le mélange, et qu'il peut très bien être de cet ordre de grandeur sur les acides aminés fournis séparément bien qu'il ne soit pas atteint après 22 jours de culture. Il semble donc que ce soit uniquement la vitesse de développement seule qui soit affectée, la masse maximum de mycélium produite étant toujours d'environ 150 mg. Une chaîne métabolique se déroulerait à vitesse faible et jouerait le rôle de facteur limitant. Si on parvenait à augmenter la vitesse de synthèse dans cette chaîne, ou à fournir le produit final de la chaîne, le facteur limitant disparaîtrait et la vitesse de croissance serait convenable. Nous avons vu que les acides aminés aromatiques et l'histidine sont synthétisés par des voies métaboliques particulières et on est amené à se demander si ces acides aminés mal synthétisés ne freineraient pas la croissance d'Arthroderma vanbreuseghemii.

- Effets des acides aminés aromatiques et de l'histidine :

Pour réaliser cette série de courbes de croissance, nous avons fourni dans tous nos milieux de culture 140 mg d'azote par un mélange d'acides glutamique et aspartique et de sérine (47 mg N/l chacun).

Le milieu ne contenant que ces trois acides aminés est pris comme témoin.

Dans un second milieu, nous ajoutons 10 mg/l de chacun des trois acides aminés aromatiques : tryptophane, phénylalanine, tyrosine. Le troisième milieu ne reçoit que 10 mg/l d'histidine, le quatrième 10 mg/l de chacun des quatre acides aminés : tryptophane, phénylalanine, tyrosine et histidine.

Chacun des milieux, 2, 3 et 4 reçoit ainsi un supplément d'azote respectivement de 2,86 ; 2,7 et 5,56 mg/l, soit inférieur à 4 %.

Un gramme de néopeptone, qui renferme 140 mg d'azote contient 7,3 mg de tryptophane selon le manuel Difco, 34 mg de phénylalanine, 46 mg de tyrosine et 24 mg d'histidine, d'après l'analyse effectuée par M. RUFFIN.

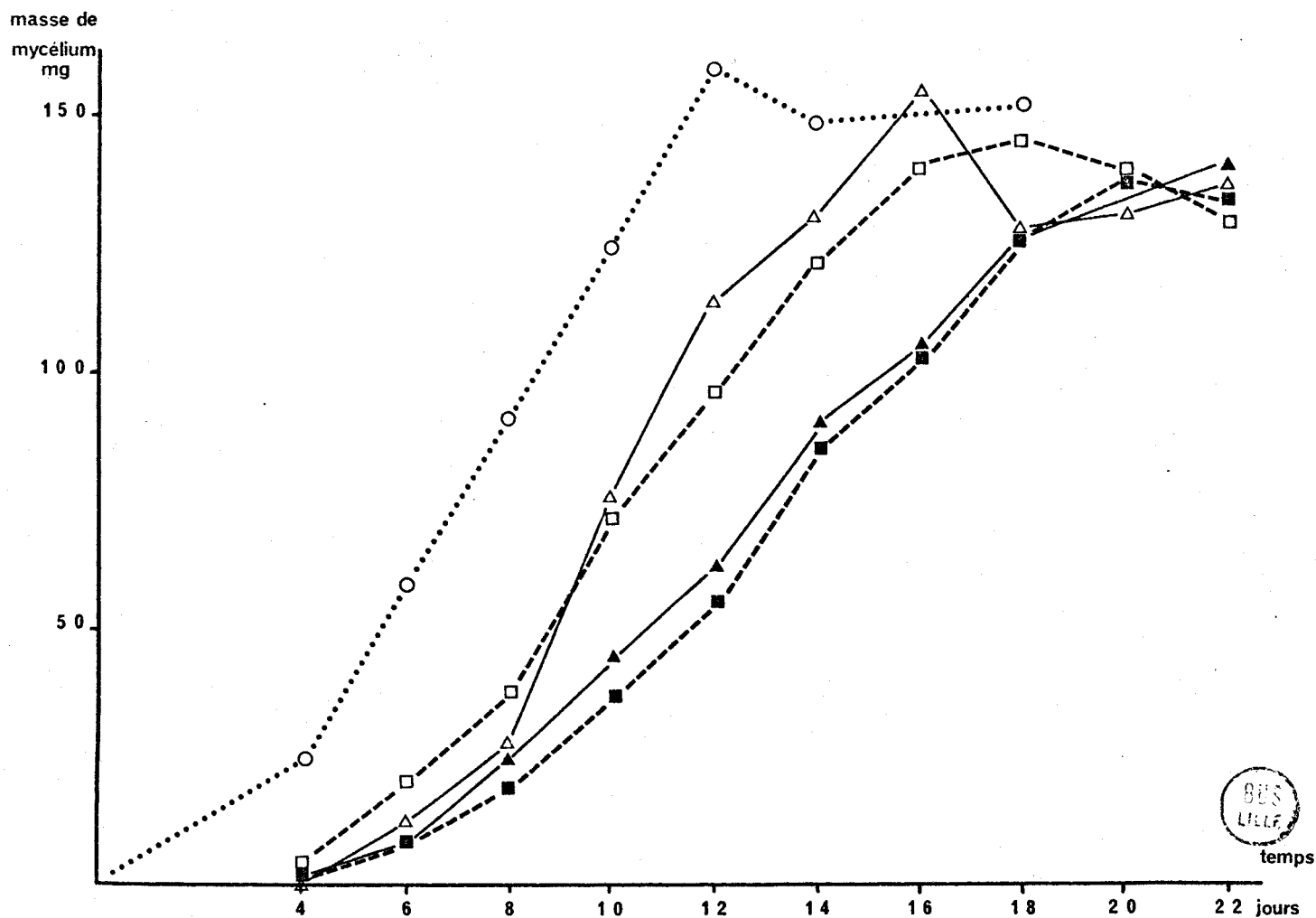
Les courbes de croissance obtenues sur ces 4 milieux sont tracées sur la figure 10 ; nous avons tracé pour comparaison une courbe obtenue sur néopeptone.

Nous voyons que la présence des acides aminés aromatiques (milieux 2 et 4) favorise la croissance et avance la date où le champignon parvient au maximum de son développement. L'adjonction d'histidine (milieux 3 et 4) n'a que peu d'effets et serait même plutôt inhibitrice en retardant légèrement la croissance.

Il semble donc que lorsqu'on fournit l'azote sous forme d'un mélange d'acides glutamique, aspartique et de sérine, la vitesse de croissance d'Arthroderma vanbreuseghemii soit limitée par la vitesse de synthèse des acides aminés aromatiques. En présence de ces derniers, la vitesse de croissance est de 14,2 mg/jour entre 6 et 16 jours. Cette vitesse est légèrement inférieure à celle observée sur la néopeptone, mais très supérieure à celle trouvée en leur absence. Le retard, pour parvenir au maximum de développement est de 4 jours en présence d'acides aminés aromatiques au lieu de 10 jours en leur absence. Ce retard est dû pour une faible part à la vitesse de croissance légèrement plus faible, mais surtout à un temps de latence plus long sur le milieu de culture synthétique que sur celui contenant de la néopeptone.

Les voies de synthèse des acides aminés aromatiques ont été étudiées chez les microorganismes, Escherichia coli et Neurospora crassa en particulier. L'acide shikimique mène à l'acide chorismique qui est lui même un précurseur commun au tryptophane d'une part, et à la phénylalanine et à la tyrosine par l'intermédiaire

Figure 10 : Croissance d'*Arthroderma vanbreuseghemii* sur un milieu de culture synthétique ; effet de l'adjonction de 10 mg/l de tryptophane, phénylalanine, tyrosine ou d'histidine.



.....○.....

courbe obtenue avec de la Néopeptone comme source d'azote (courbe tracée pour comparaison).

——▲——

milieu synthétique témoin sans tryptophane, ni phénylalanine, ni tyrosine, ni histidine (milieu 1).

——△——

milieu synthétique additionné de tryptophane, phénylalanine et tyrosine (milieu 2).

-----■-----

milieu synthétique additionné d'histidine (milieu 3).

-----□-----

milieu synthétique additionné de tryptophane, phénylalanine, tyrosine et histidine (milieu 4).



de l'acide préphénique, d'autre part. La chaîne peut être bloquée à un niveau quelconque, et on connaît des mutants incapables de synthétiser les acides aminés aromatiques bien que mutés pour un seul gène. Dans ce cas, la mutation porte sur un précurseur commun aux trois acides aminés.

Bien que l'on ait tendance à généraliser à tous les micro-organismes cette voie de synthèse, il semble que certaines espèces puissent en utiliser d'autres. Ce serait le cas de Trichophyton rubrum (ZUSSMAN et collaborateurs 1961, 1967, 1969 et 1970). Ces auteurs ont montré que ce dermatophyte synthétise davantage de pigments si on lui fournit de la phénylalanine ; ce fut le point de départ de leurs recherches qui ont abouti à l'étude des voies de synthèse des acides aminés aromatiques. Selon ces auteurs, T. rubrum ne synthétise pas d'acide shikimique ; il est incapable d'utiliser ce même acide si on le fournit dans le milieu de culture ; l'acide shikimique pénètre cependant à l'intérieur des hyphes. Les mêmes auteurs ont également montré qu'une partie de la radioactivité de l'acétate marqué fourni au champignon était retrouvée dans les molécules de phénylalanine. La synthèse des acides aminés aromatiques ne se fait donc pas chez T. rubrum par la voie de l'acide shikimique ; il est possible que la voie utilisée par ce champignon soit peu efficace, et en fournissant de la phénylalanine la synthèse des pigments est augmentée. Les dermatophytes formant un groupe de champignons très homogènes, il est probable qu'Arthroderma vanbreuseghemii utilise la même voie de synthèse que Trichophyton rubrum pour élaborer les acides aminés aromatiques, mais en quantité insuffisante pour permettre une croissance rapide.

Nous avons voulu préciser les déficiences d'A. vanbreuseghemii : synthétise-t-il mal l'ensemble des acides aminés aromatiques, ou l'un d'eux seulement ? Le champignon que nous cultivons est-il capable d'utiliser l'acide shikimique, et de croître plus rapidement en sa présence ? Une concentration double d'acides aminés aromatiques permet-elle de rapprocher la courbe de croissance de celle obtenue sur néopeptone ?.

- Effets de deux acides aminés aromatiques :

Pour savoir si A. vanbreuseghemii synthétise mal un, deux ou les trois acides aminés aromatiques, nous avons établi des courbes de croissance sur :

- le milieu de culture synthétique sans acides aminés aromatiques ;
- le même milieu additionné de 10 mg/l de chacun des trois acides aminés aromatiques. Ces deux milieux de culture sont utilisés comme témoins ;
- trois milieux de cultures auxquels on additionne deux seulement des trois acides aminés aromatiques (10 mg/l de chaque).

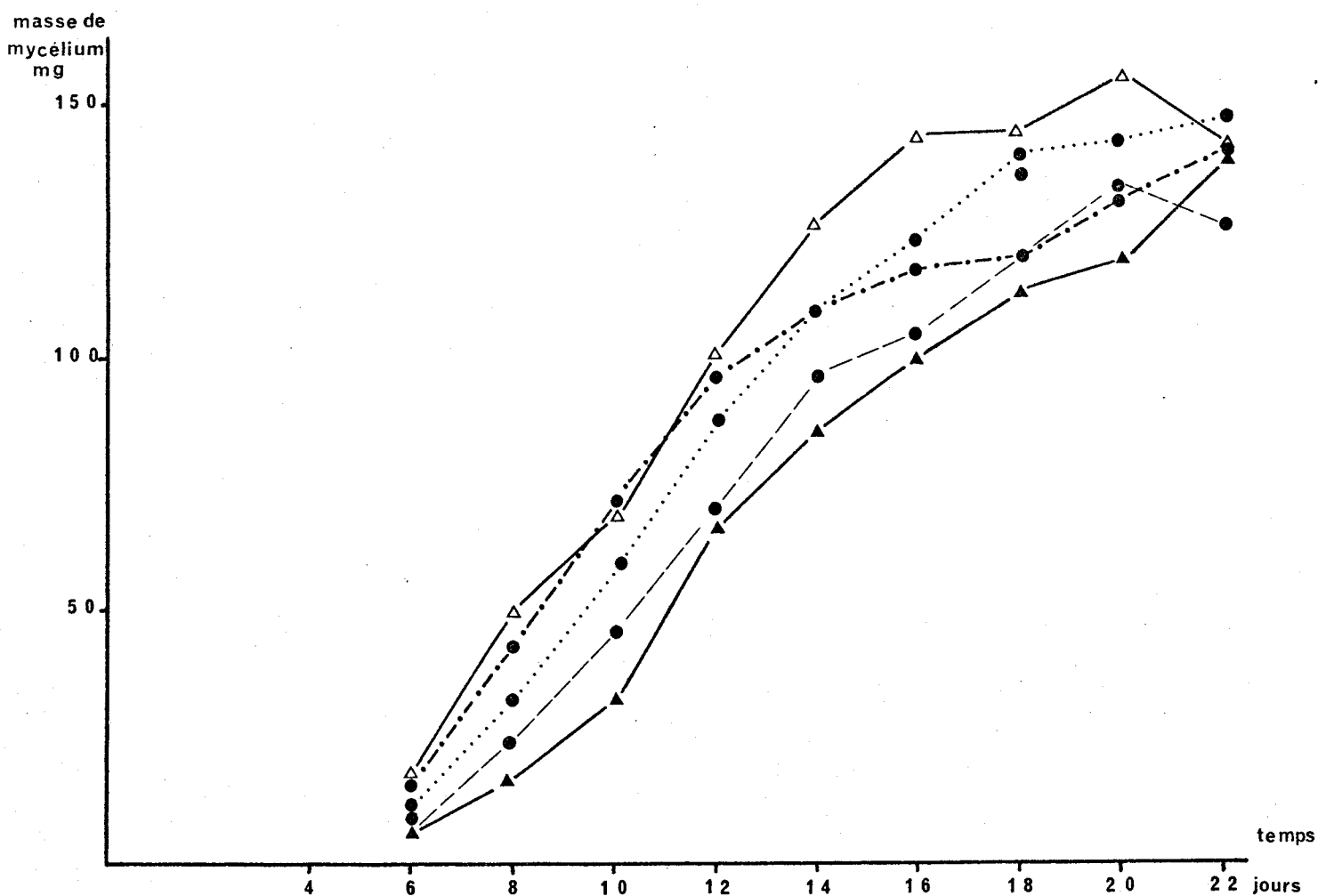
Les résultats, consignés dans la figure 11, montrent que la suppression de l'un quelconque des trois acides aminés aromatiques décale la courbe de croissance correspondante vers la courbe témoin obtenue sur un milieu dépourvu de ces acides aminés aromatiques. Dans les conditions de notre expérimentation, l'effet le plus marqué est observé avec la suppression de la phénylalanine. La courbe obtenue sur le milieu sans tryptophane est tout d'abord confondue avec la courbe témoin correspondant au milieu contenant tous les acides aminés aromatiques ; après 12 jours de culture, cette courbe s'infléchit. Il semblerait donc que la synthèse de tryptophane soit suffisante pendant la première partie du développement. La courbe obtenue avec la suppression de la tyrosine est à égale distance des deux courbes témoins.

Arthroderma vanbreuseghemii synthétise en quantité insuffisante l'ensemble des acides aminés aromatiques ; la fourniture dans le milieu de culture de deux de ces acides augmente la quantité de mycélium produite, ce qui permet de penser que le métabolisme de ces trois acides aminés est interdépendant.

- Effet de l'acide shikimique :

Nous avons voulu savoir si l'adjonction d'acide shikimique pouvait remplacer celle d'acides aminés aromatiques. Pour cet essai, nous avons de nouveauensemencé des milieux de culture témoins dont la composition était la même que ceux de l'expérience précédente. Nous avons dans un troisième milieu ajouté 29 mg/l

Figure 11 : Croissance d'Arthroderma vanbreuseghemii sur des milieux de culture synthétiques renfermant aucun, deux ou trois acides aminés aromatiques.



Culture en présence :

- ▲— d'aucun acide aminé aromatique
- △— des trois acides aminés aromatiques
- - - ● - - - de tryptophane et de tyrosine
- ● ····· de tryptophane et de phénylalanine
- · - · ● - · - · de tyrosine et de phénylalanine



d'acide shikimique à la place des acides aminés aromatiques. Cette quantité d'acide shikimique permet la synthèse de 10 mg de chacun des trois acides aminés aromatiques.

Nous avons également comparé à ces trois courbes, une quatrième obtenue en doublant la quantité d'acides aminés aromatiques fournie dans le milieu de culture, soit 20 mg/l de chaque.

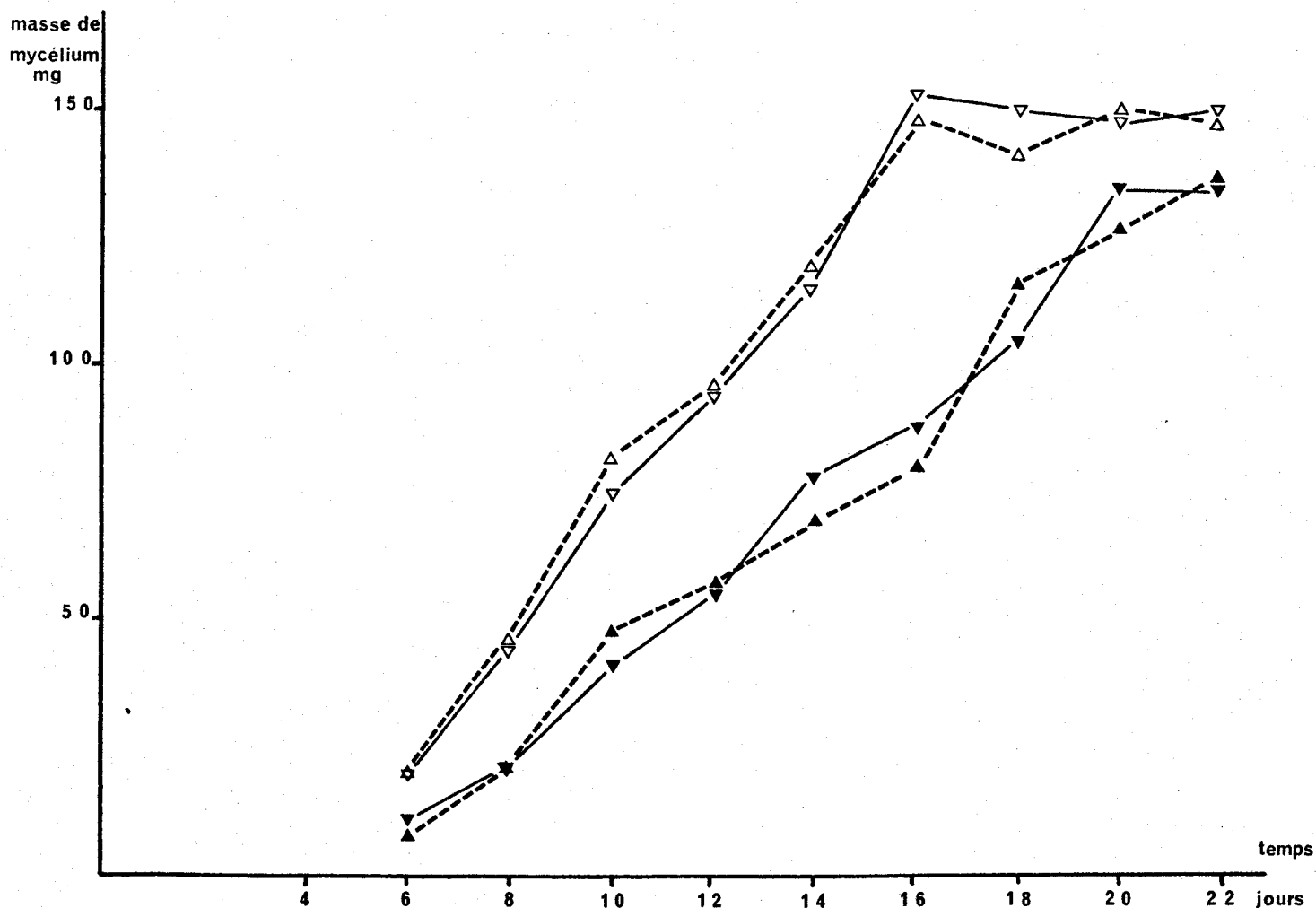
Nous avons pu ainsi tracer quatre courbes qui se confondent deux à deux. L'acide shikimique n'a eu aucun effet sur la croissance, tandis qu'une concentration double d'acides aminés aromatiques dans le milieu de culture n'a pas permis d'augmenter la masse de mycélium produite (figure 12).

Le fait que l'acide shikimique ne puisse remplacer les acides aminés aromatiques ne permet pas de dire qu'A. vanbreuseghemii n'utilise pas la voie de synthèse correspondante, car celle-ci peut être ralentie bien après la synthèse de l'acide shikimique. C'est cependant une analogie avec Trichophyton rubrum.

L'augmentation de la dose d'acides aminés aromatiques n'a pas permis d'augmenter la quantité de mycélium produite : la dose que nous avons choisie pour notre premier essai était donc suffisante et il n'est pas besoin d'en porter autant qu'en apporte la néopeptone. D'ailleurs, selon l'hypothèse que nous avons formulée : "la vitesse de croissance faible est due à une vitesse de synthèse faible dans une chaîne métabolique", une dose de 10 mg/l de chacun des trois acides aminés aromatiques devait être suffisante puisqu'elle permettait d'obtenir une vitesse de croissance correcte. On constate qu'on ne raccourcit pas le temps de latence en augmentant la dose d'acides aminés aromatiques, ce qui semble logique.

Lorsque nous fournissons l'azote sous forme de néopeptone, Arthroderma vanbreuseghemii n'a pas besoin de faire fonctionner des chaînes métaboliques complexes pour obtenir des acides aminés. Il lui suffit de les puiser dans le milieu de culture. Lorsque nous faisons croître ce champignon sur un milieu de culture synthétique, le temps de latence est augmenté et doit correspondre à la mise en place de ces chaînes métaboliques complexes.

Figure 12 : Croissance d'Arthroderma vanbreuseghemii sur des milieux de culture synthétiques : effet de l'acide shikimique et des acides aminés aromatiques.



- ▲----- milieu de culture synthétique sans acide shikimique, ni acides aminés aromatiques.
- △----- milieu de culture synthétique renfermant 10 mg/l de chacun des acides aminés aromatiques.
- ▼----- milieu de culture synthétique renfermant 29 mg/l d'acide shikimique (correspondant à la synthèse possible de 10 mg de chacun des acides aminés aromatiques).
- ▽----- milieu de culture synthétique renfermant 20 mg/l de chacun des acides aminés aromatiques.

En résumé, Arthroderma vanbreuseghemii n'utilise pas l'azote minéral. Il peut se développer si on lui fournit l'azote à partir de certains acides aminés : les acides glutamique et aspartique, l'alanine, la sérine ou l'arginine. Dans ces conditions cependant, sa croissance est faible, ou plutôt sa vitesse de croissance est faible car en allongeant le temps de culture, il semble que l'on puisse obtenir la même quantité de mycélium à partir de la même quantité d'azote. Mais en fournissant l'azote sous forme d'un mélange de trois acides aminés, les acides glutamique, aspartique et la sérine, qui sont des "chefs de file" dans la synthèse des autres acides aminés, on augmente la vitesse de croissance. Dans ces conditions, la vitesse de croissance est encore limitée par la vitesse de synthèse des acides aminés aromatiques, et l'apport de 10mg/l de chacun des trois acides aminés aromatiques pour 140 mg d'azote par litre suffit pour obtenir une vitesse de croissance sensiblement égale à celle observée avec la néopeptone. Ces déficiences multiples dans le métabolisme azoté d'Arthroderma vanbreuseghemii sont peut-être le reflet de son mode de nutrition dans la nature où il hydrolyse la kératine, se procurant ainsi l'ensemble des acides aminés dont il a besoin sans les synthétiser. On peut aussi peut-être faire le rapprochement entre ces déficiences dans le métabolisme azoté et l'adaptation à un mode de vie parasitaire qui semble s'opérer chez cette espèce de dermatophyte.

EQUILIBRE DU MILIEU DE CULTURE ET REPRODUCTION SEXUEE

Après avoir défini les exigences d'Arthroderma vanbreuseghemii pour permettre sa croissance, il convient d'équilibrer les quantités de carbone et d'azote de manière à obtenir la reproduction sexuée dans le meilleur temps possible et avec un maximum de périthèces.

- Choix d'une source de carbone :

Les milieux utilisés pour cette recherche contiennent le milieu minéral, 2 g/l de la source carbonée, 140 mg/l d'azote

apportés par les acides glutamique et aspartique et la sérine, 10 mg/l de chacun des acides aminés aromatiques et les vitamines ; le pH est amené à 6,0. Les sources carbonées essayées sont le glucose, le fructose, le xylose, le maltose, le saccharose et le galactose, choisis arbitrairement car on ne possède aucune donnée sur les éléments que le champignon utilise naturellement.

L'expérience est conduite en milieu liquide en tubes de Legroux munis de baguettes de verre. Les résultats sont consignés dans le tableau 6 .

Tableau 6 : Dates d'apparition des ébauches sexuelles et de maturation des périthèces d'*Arthroderma vanbreuseghemii* cultivé sur un milieu de culture synthétique en présence de différentes sources de carbone.

Source carbonée	Date d'apparition des ébauches (jours)	Date de maturation des périthèces (jours)
Glucose	4	13
Fructose	4	-
Xylose	6	-
Maltose	4	-
Saccharose	4	-
Galactose	4	-

Le signe "-" indique qu'il n'y avait pas d'asques mûrs dans les cultures à 20 jours.

Il faut noter que la croissance était très faible sur le xylose et faible sur le galactose.

Il est également remarquable que les couples sexuels apparaissent très tôt sur des cultures composées d'un simple voile mycélien très mince. Nous avons, à la suite de cet essai, retenu le glucose comme source de carbone.

- Equilibre carbone - azote :

Comme nous l'avons fait pour Arachniotus albicans, nous avons réalisé 30 variations du milieu de culture utilisé précédemment : les concentrations en glucose essayées sont : 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 et 16 g/l. Pour la source d'azote, nous en avons fait varier la concentration totale en gardant les mêmes proportions entre les différents constituants : acides glutamique et aspartique, sérine, tryptophane, phénylalanine et tyrosine. Nous avons négligé pour les calculs les quantités d'azote apportées par les acides aminés aromatiques, la proportion étant toujours la même par rapport à la quantité d'azote totale, soit 2 %. Nous fournissons 10 mg/l de chacun des acides aminés aromatiques pour une quantité d'azote qui serait de 140 mg/l.

Nous avons réalisé les milieux liquides et gélosés correspondants. Les pH de tous les milieux ont été amenés à 6,0 avant autoclavage.

Il n'a pas été facile de déterminer le temps nécessaire pour que les périthèces soient mûrs ; en effet, la maturation est progressive : on observe d'abord quelques rares asques mûrs, puis chaque jour le nombre d'asques mûrs augmente et la plupart des asques sont mûrs au bout de 3 ou 4 jours. L'essai a été réalisé à deux reprises, et nous indiquons dans le tableau la date d'apparition des couples sexuels, ainsi que celle où les premiers asques mûrs ont été observés. Ces résultats sont ceux obtenus en milieu liquide. Sur les milieux gélosés, les deux souches, + et -, ont été ensemencées à 5 mm l'une de l'autre, et les ébauches apparaissent plus tard, car les colonies doivent se rejoindre ; la date de maturation est cependant non modifiée.

Nous remarquons, d'après le tableau 7, que les résultats n'ont pas tendance à s'organiser selon des lignes diagonales, comme nous l'avons remarqué chez Arachniotus albicans. Ici, les concentrations d'azote égales ou supérieures à 200 mg/l ne permettent pas l'évolution des ébauches de périthèces ; nous observons

Tableau 7 : Date de maturation des périthèces d'Arthroderma vanbreuseghemii sur des milieux de culture synthétiques contenant différentes quantités d'azote et de glucose.

Glucose en g/l	Azote en mg/l				
	25	50	100	200	400
0,5	13	11	13	-	-
1	13	11	13	-	-
2	13	11	13	-	-
4	13	12	13	-	-
8	13	13	13	-	-
16	-	-	-	-	-

le signe "-" indique l'absence de périthèces mûrs après 21 jours de culture.

pour ces concentrations un développement mycélien et une sporulation asexuée importants. Par contre, Arthroderma vanbreuseghemii tolère des quantités assez importantes de glucose, et ceci tend à disposer les résultats en bandes verticales. En fait les concentrations en glucose supérieures ou égales à 4 g/l sont peu favorables à la reproduction sexuée. En effet, pour de telles concentrations, on note un développement mycélien important surtout en milieu gélosé et à côté des périthèces mûrs, une grande proportion de pseudo-périthèces aussi bien en milieu liquide que gélosé. Ces pseudo-périthèces ont l'apparence macroscopique des vrais périthèces, mais le microscope révèle qu'il s'agit de masses stromatiques ne contenant pas d'asques et remplies de spores semblables aux microconidies de cette espèce. Nous avons aussi noté que le développement mycélien est très faible pour les concentrations de 25 mg/l d'azote, ceci est très net en milieu liquide où l'on observe un voile portant des périthèces rares. Compte tenu de ces deux faits, rareté des périthèces vrais avec les concentrations en glucose supérieures à 4 g/l, et développement faible en présence de 25 mg N/l, A. vanbreuseghemii exige des conditions assez strictes en ce qui concerne les

quantités de carbone et d'azote pour produire des périthèces. L'optimum de ces conditions semble réalisé avec 0,5 g/l de glucose, et 50 mg N/l. L'équilibre carbone-azote d'un tel milieu n'est pas très différent de celui du milieu de Sabouraud. Sur le milieu de culture synthétique, l'optimum est obtenu pour des concentrations en carbone et azote inférieures à celle du milieu de Sabouraud dilué au 1/10. Dans les travaux de TAKASHIO, nous n'avons pas trouvé mention qu'il ait utilisé des dilutions du milieu de Sabouraud supérieures à 1/10 pour faire se reproduire sexuellement A. vanbreuseghemii ; il a essayé de telles dilutions pour d'autres espèces, et l'optimum, qu'il définit par le plus grand nombre de périthèces produits, n'a jamais été trouvé inférieur à 1/10. Nous discuterons ces observations dans un prochain paragraphe consacré à la reproduction sexuée, sur milieu de culture synthétique d'autres espèces de dermatophytes.

- Essai comparé de milieux synthétiques, du milieu de Sabouraud dilué et du milieu à base d'avoine pour l'obtention de périthèces de dermatophytes :

Il nous a semblé intéressant d'ensemencer, sur les 30 variations du milieu de culture synthétique, plusieurs espèces de dermatophytes afin de définir pour chacun d'eux un rapport carbone-azote favorable à la reproduction sexuée.

Nous n'avons pas étudié pour chaque espèce les exigences nutritives pour la croissance. Une étude des besoins en acides aminés serait nécessaire si on voulait mettre au point un milieu de culture synthétique pour l'un d'eux. Le milieu utilisé pour Arthroderma vanbreuseghemii nous a semblé suffisamment complet pour tenter cet essai, à titre comparatif. Nous avons ensemencé en même temps, pour chaque espèce, des milieux de Sabouraud dilués au 1/2, 1/4, 1/8, et 1/10 additionnés de sels minéraux, ainsi qu'un milieu à base d'avoine additionné de sels minéraux tel que nous l'avons décrit pour Arachniotus albicans.

Cet essai a été conduit sur milieu gélosé en boîtes de Pétri à 24°C et à l'obscurité. La présence ou l'absence de périthèces mûrs a été relevée après 21 jours de culture. Nous avons ensemencé les espèces suivantes :

- Nannizzia gypsea souches RV 15250 et RV 15251
- Nannizzia incurvata souches RV 15248 et RV 15249
- Nannizzia fulva souches RV 15252 et RV 15253
- Nannizzia persicolor souches RV 28709 et RV 28710
- Arthroderma simii souches RV 25472 et RV 25473
- Arthroderma benhamiae souches SA 3 et SA 5
(race américano-européenne)
- Arthroderma benhamiae souches RV 27926 et RV 25293
(race africaine).

Les deux souches de chaque espèce sont compatibles^{**}. Nous donnerons d'abord les résultats obtenus pour chaque espèce en les discutant, et nous essayerons ensuite de tirer des conclusions sur l'ensemble des observations.

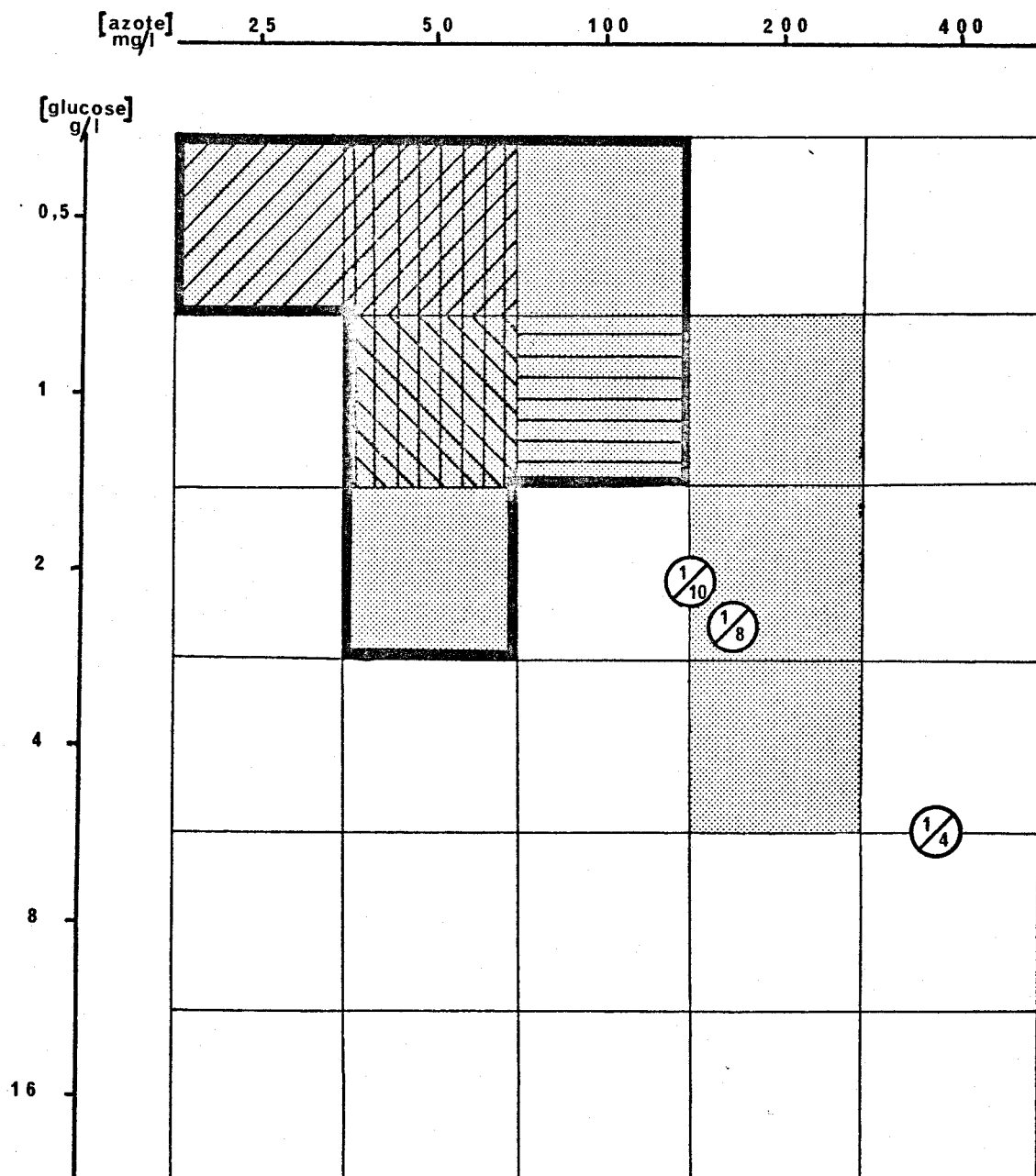
Nannizzia gypsea demeure stérile sur les milieux de culture synthétiques, bien que les deux souches soient fertiles sur le milieu à base d'avoine et que quelques périthèces mûrs aient été trouvés sur le milieu de Sabouraud dilué au 1/10 ; ce dernier milieu dilué au 1/8 ne permet plus la maturation des périthèces tandis qu'aucune ébauche n'a été observée après 21 jours de culture sur les dilutions plus faibles.

Nannizzia fulva fructifie encore plus difficilement. Nous n'avons trouvé de périthèces que sur le milieu à base d'avoine ; ceux-ci étaient mûrs, mais il faut noter dans ces conditions de culture la présence de mycélium aérien, indice d'une tendance à un développement uniquement végétatif.

Les autres espèces ont produit des périthèces mûrs en 21 jours sur une ou plusieurs variations du milieu synthétique. La figure 13 résume ces résultats.

** L'ensemble de ces souches nous a été donné par M. TAKASHIO que nous remercions sincèrement.

Figure 13: Reproduction sexuée de diverses espèces de dermatophytes sur un milieu de culture synthétique contenant différentes quantités de glucose et d'azote.



Les cases couvertes d'une trame représentent les équilibres favorables à la maturation des périthèces dans un délai de 21 jours des espèces suivantes :



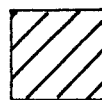
Nannizzia incurvata



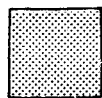
Arthroderma benhamiae
race africaine



Nannizzia persicolor



Arthroderma benhamiae
race américano-européenne



Arthroderma simii



Arthroderma vanbreuseghemii
souches semi-compatibles



Pour comparaison, emplacements des dilutions du milieu de Sabouraud.

BUS
LILLE

Nannizzia incurvata ne produit de périthèces mûrs que sur les milieux à base d'avoine et de Sabouraud dilué au 1/4, et sur les milieux synthétiques en présence de 1 g/l de glucose et de 100 mg/l à l'exception de tout autre équilibre.

Nannizzia persicolor a fructifié pauvrement sur le milieu à base d'avoine, la dilution au 1/10 du milieu de Sabouraud, ainsi que sur deux équilibres du milieu synthétique (0,5 ou 1 g/l de glucose et 50 mg N/l).

Arthroderma simii est l'espèce qui, au contraire, produit le plus facilement des périthèces mûrs : outre le milieu à base d'avoine et les dilutions au 1/8 et 1/10 du milieu de Sabouraud, 9 équilibres différents du milieu synthétique sont favorables à la reproduction sexuée dans un délai de 21 jours. L'examen du tableau montre que ces équilibres ont tendance à s'organiser selon une diagonale, traduisant ainsi l'importance du rapport carbone/azote. On retrouve pour cette espèce les conclusions que nous avons formulées pour Arachniotus albicans.

Les deux races d'Arthroderma benhamiae ont des exigences précises et différentes. Les souches de la race américano-européenne ont produit des périthèces sur le milieu à base d'avoine et sur les dilutions 1/8 et 1/10 du milieu de Sabouraud, mais ceux-ci n'étaient pas mûrs au bout de 21 jours de culture. En présence de 0,5 g/l de glucose, et de 50 mg/l d'azote nous avons obtenu des périthèces nombreux et mûrs sur le milieu synthétique ; un deuxième équilibre (0,5 g/l de glucose et 25 mgN/l) donne le même résultat, mais les périthèces sont plus petits. Les souches de la race africaine se reproduisent au contraire mieux sur les milieux naturels qui permettent la maturation des périthèces (milieu à base d'avoine et milieux de Sabouraud dilués au 1/8 et 1/10). Pour cette race africaine, aucun milieu synthétique n'est excellent, les périthèces produits étant moins nombreux et plus petits que sur le milieu de Sabouraud dilué au 1/10. Un seul équilibre du milieu (1 g/l de glucose et 50 mg N/l) permet la maturation des périthèces, produits en faible nombre.

Pour l'ensemble des espèces qui ont fructifié, nous remarquons que les équilibres carbone-azote efficaces pour la sexualisation se répartissent autour d'une ligne diagonale correspondant au rapport carbone / azote du milieu de Sabouraud. Il n'est pas étonnant que TAKASHIO (1973) ait obtenu des périthèces de dermatophytes en diluant ce milieu. Cependant, nous observons sur les milieux synthétiques que nous avons défini, que les périthèces sont produits sur des dilutions plus grandes et que les concentrations en glucose et en azote correspondant au milieu de Sabouraud dilué au 1/10 par exemple, et reprises en milieu synthétique sont trop élevées. Dans un travail récent, DAVIDSSON et UNESTAM (1974) ont étudié la reproduction sexuée d'Arthroderma benhamiae sur un milieu de culture synthétique ; les souches qu'ils ont utilisées sont de la race américaine. Ils observent qu'un rapport carbone / azote de l'ordre de 10 est nécessaire pour la production de périthèces ce qui correspond à ce que nous avons observé. Mais comme TAKASHIO, ils utilisent des concentrations plus élevées que nous. Pour essayer de trouver des explications à ces divergences, nous avons noté que ces auteurs cultivent à 30°C, température trouvée optimale par eux, qu'ils relèvent leurs résultats au bout de 4 ou 5 semaines et qu'ils utilisent une source d'azote très différente de celle que nous avons utilisé. Il est possible qu'en cultivant à 24°C, nous soyons loin de l'optimum thermique et qu'il faille un équilibre carbone-azote plus strict pour obtenir la reproduction sexuée, mais l'équilibre que nous avons trouvé devrait être très près de l'optimum. Il est probable qu'en augmentant le temps de culture nous obtiendrions des périthèces mûrs sur des concentrations plus élevées, mais ce n'est pas certain. La nature différente de la source azotée nous paraît plus intéressante pour fournir une explication ; ces auteurs utilisent soit du glutathion, soit les acides aminés qui le composent, c'est à dire acide glutamique, glyco-colle et cystéine. Ces acides ont été fournis soit séparément, soit en mélange. D'après les résultats relevés dans la publication, nous avons construit un tableau interprétatif (tableau 9) pour lequel nous n'avons tenu compte que des renseignements qui pouvaient être comparés avec nos propres

Tableau 9 : Reproduction sexuée d'*Arthroderma benhamiae* sur des milieux de culture synthétiques en présence de différents équilibres glucose-azote, d'après les résultats publiés par DAVIDSSON et UNESTAM(1974)

Concentration en glucose (g/l)	Nature de la source d'azote	Concentration en azote (mg/l)				
		45,5	91	136,5	182	273
0	GLU	+++	0	-	-	0
	GLY	+	0	-	-	0
	CYS	+++	+++	-	-	0
	GLU+GLY	-	+	-	0	-
	GLU+CYS	-	+++	-	+	-
	GLY+CYS	-	+++	-	+++	-
	GLU+GLY+CYS	-	-	0	-	0
	GSH	-	-	+++	-	+
1	GLU	+++	+	-	-	0
	GLY	+++	+++	-	-	0
	CYS	+++	0	-	-	0
	GLU+GLY	-	+	-	0	-
	GLU+CYS	-	+	-	+	-
	GLY+CYS	-	+++	-	+++	-
	GLU+GLY+CYS	-	-	0	-	+
	GSH	-	-	+++	-	+
5	GLU	0	0	-	-	0
	GLY	0	0	-	-	0
	CYS	0	0	-	-	0
	GLU+GLY	-	0	-	+	-
	GLU+CYS	-	0	-	+++	-
	GLY+CYS	-	0	-	+++	-
	GLU+GLY+CYS	-	-	+++	-	+++
	GSH	-	-	+++	-	+++

Légende : GLU acide glutamique
 GLY glycoColle
 CYS cystéine
 GSH glutathion
 +++ périthèces avec de nombreuses ascospores
 + périthèces avec peu d'ascospores
 0 pas de périthèces avec ascospores
 - équilibre non testé



Nous n'avons retenu dans les résultats publiés par ces auteurs que les données comparables à nos propres résultats ; en particulier les croix de notre tableau indiquent l'état de maturation des périthèces et non leur nombre qui est cependant cité dans le travail de DAVIDSSON et UNESTAM.

résultats ; en particulier nous n'avons pas indiqué les nombres de périthèces mentionnés par les auteurs et n'avons retenu que l'état de maturation de ces périthèces. En effet, sur certains milieux ces auteurs indiquent un nombre important de périthèces, mais ceux-ci ne contiennent aucun asque et correspondent peut-être à ce que nous avons appelé pseudo-périthèces.

L'examen de ce tableau interprétatif indique que lorsqu'un seul acide aminé est utilisé comme source d'azote, on ne peut obtenir de périthèces mûrs qu'en présence de 0 ou 1 g/l de glucose et dans ce cas, il faut fournir 45,5 ou 91 mg/l d'azote ; ces chiffres sont proches de ce que nous avons observé dans les conditions expérimentales que nous avons définies. Par contre, lorsque la source d'azote est constituée par un mélange d'acides aminés ou par le glutathion, des concentrations plus fortes du milieu permettent aussi la reproduction sexuée. Il semble donc que la nature de la source d'azote ait une importance. Il serait intéressant de savoir comment ce champignon utilise ces différentes sources azotées, en étudiant par exemple les courbes de croissance sur les milieux correspondant ; cela nous aiderait sans doute à comprendre pourquoi certaines sources d'azote peuvent être employées à des concentrations plus fortes : peut-être ne sont-elles pas utilisées dans leur totalité. Il faudrait alors expliquer pourquoi il faut respecter l'équilibre carbone - azote en comptant l'azote inutilisable. Nous n'avons eu connaissance du travail de DAVIDSSON et UNESTAM que très récemment et nous n'avons pas réalisé ces courbes de croissance.

- Reproduction sexuée de deux souches peu compatibles
d'*Arthroderma vanbreuseghemii* :

Nous avons également testé au cours de cet essai comparatif de milieux de culture, deux souches peu compatibles d'*Arthroderma vanbreuseghemii* ; en effet, ce sont de telles souches peu compatibles qu'il nous faudra croiser pour étudier le déterminisme des phénomènes d'incompatibilité. Nous exposerons les résultats de ces confrontations dans le paragraphe suivant.

Les deux souches peu compatibles utilisées pour cette étude ont été découvertes parmi 18 souches de Trichophyton mentagrophytes isolées de rongeurs par HOUIN et coll. (1972)**. Pour cela, nous avons effectué pour chacune des 18 souches, des isolements monospores et déterminé le signe d'incompatibilité par la méthode préconisée par STOCKDALE (1968), et modifiée par TAKASHIO (1973). Cette méthode consiste à confronter la souche de signe inconnue avec des souches + et - d'Arthroderma simii ; si les souches sont de signe contraire, on observe une stimulation de la croissance à la limite des deux colonies et assez souvent des couples sexuels. Nous avons ensuite confronté les souches de signe opposé et trouvé deux souches : 95.1 et 121.1 qui produisent ensemble de rares périthèces sur milieu de Sabouraud dilué additionné de sels minéraux. Par confrontation de ces souches avec les souches types RV 27960 et RV 2761 d'A. vanbreuseghemii, nous avons obtenu quelques périthèces fertiles montrant ainsi que les souches 91.1 et 121.1 appartiennent à cette espèce.

Les souches 95.1 et 121.1 ont été confrontées sur le milieu à base d'avoine additionné de sels minéraux, sur les dilutions du milieu de Sabouraud additionnées de sels minéraux et sur les 30 variations du milieu synthétique. La présence de périthèces mûrs a été relevée après 21 jours de culture. Le milieu à base d'avoine ainsi que les dilutions au 1/8 et 1/10 du milieu de Sabouraud permettent la production de périthèces. Sur les milieux gélosés, on observe à la limite des deux colonies une bande de 2 ou 3 mm ne portant pas de conidies alors que le reste des thalles en est couvert, ce qui permet de distinguer les deux souches. On peut alors remarquer que les périthèces sont produits uniquement en bordure de la souche 95.1. Ceci traduit le caractère semi-compatible des deux souches. Les périthèces sont rares sur les dilutions du milieu de Sabouraud, plus nombreux sur le milieu à base d'avoine. Sur le

** Nous remercions vivement M. HOUIN de nous avoir confié l'ensemble de ces souches.

milieu de culture synthétique, ces souches semi-compatibles se sont montrées plus exigeantes que les souches-type très compatibles en effet, elles n'ont produit de périthèces que sur 6 équilibres différents du milieu, au lieu de 15 pour les souches très compatibles ; les 6 équilibres favorables sont entourés d'un trait épais sur la figure 13. Il faut remarquer cependant que même pour les souches très compatibles, ces 6 équilibres étaient les meilleurs. Parmi ces équilibres glucose - azote, ceux réalisés avec 0,5 ou 1 g/l de glucose associés à 50 mg N/l permettent la production de très nombreux périthèces, et sont donc supérieurs aux milieux non synthétiques. Le caractère semi-compatible des souches demeure cependant et les périthèces ne sont produits que du côté de la souche 95.1. Nous avons ainsi dissocié la semi-compatibilité de la faible quantité de périthèces produits ; si les conditions de culture sont favorables, des souches semi-compatibles produisent de nombreux périthèces, mais la compatibilité n'est pas réciproque.

C O N C L U S I O N

-:-:-

La reproduction sexuée de certains dermatophytes a souvent été obtenue en culture au laboratoire sur divers milieux naturels (terre et kératine, décoction d'avoine) ou semi-synthétiques (dilutions du milieu de Sabouraud). Mais, dans ces conditions, les résultats sont aléatoires : pour une espèce donnée, le croisement de deux souches de signes d'incompatibilité opposés ne produit pas toujours des périthèces.

Comme pour les autres champignons, la reproduction des dermatophytes dépend de facteurs externes (température, lumière, milieu de culture) et de facteurs internes (compatibilité des souches). Il n'était pas possible de vérifier expérimentalement en une seule fois cet ensemble d'éléments. Nous avons choisi de déterminer en premier lieu le rôle des facteurs externes. Pour éliminer l'action possible des facteurs internes, deux modèles expérimentaux ont été utilisés : Arachniotus albicans, Gymnoascacée homothallique et Arthroderma vanbreuseghemii, Gymnoascacée hétérothallique. Nous disposions en effet, pour cette espèce, de deux souches très fertiles par croisement sur les milieux naturels et semi-synthétiques.

Les données bibliographiques déterminant les conditions de température (24°C) et d'éclairement (obscurité totale), nous ont permis de limiter nos recherches à la définition précise des éléments d'un milieu de culture synthétique. En effet, chez de nombreuses espèces de champignons, l'équilibre du milieu de

culture stimule ou inhibe la reproduction sexuée. Mais seul un milieu de culture synthétique dont on connaît parfaitement les éléments, peut être modifié, composant par composant, jusqu'à obtenir l'équilibre nécessaire.

Un champignon assure sa nutrition à partir d'ions minéraux, d'une source de carbone, d'une source d'azote et éventuellement de facteurs de croissance. Pour Arachniotus albicans, notre premier sujet expérimental, le maltose à la concentration de 1 ou 2 g/l et le glycolle à raison de 100 mg N/l conviennent comme sources carbonée et azotée, mais en fait c'est le rapport carbone / azote qui joue le rôle déterminant dans le phénomène de sexualisation.

Nous n'avons pu transposer immédiatement les données définies ci-dessus pour l'obtention de périthèces d'Arthroderma vanbreuseghemii et l'ensemble des éléments nécessaires à sa sexualisation a dû être déterminé à nouveau. Tout d'abord, la nature des divers éléments a été définie afin de permettre une croissance harmonieuse de l'espèce étudiée. Nous avons cherché à faire coïncider la courbe de croissance obtenue sur milieu synthétique avec celle observée sur le milieu semi-synthétique, antérieurement précisé par TAKASHIO. Le glucose constitue un bon élément carboné, mais aucune des sources d'azote essayées dans une première série de cultures n'a été jugée convenable : A. vanbreuseghemii ne se développe pas en l'absence d'une source azotée organique, ni en présence de certains acides aminés fournis séparément. Sur d'autres acides aminés, l'espèce croît mais à une vitesse très lente. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'A. vanbreuseghemii synthétise mal les acides aminés, soit parce qu'il effectue mal les transaminations, soit par production en quantité insuffisante d'acides α -cétoniques. En fournissant simultanément de l'acide glutamique, de l'acide aspartique et de la sérine, précurseurs dans différents groupes de synthèse des acides aminés, la croissance en effet est meilleure que dans

les conditions précédentes. Cependant, en présence de ce mélange, la vitesse de croissance est encore limitée par la vitesse de synthèse des acides aminés aromatiques ; par contre, la vitesse de synthèse de l'histidine n'est pas un facteur limitant.

Les conditions optimales pour la croissance ainsi définies, nous avons recherché l'équilibre carbone - azote optimal pour la reproduction sexuée : il est réalisé par 0,5 à 1 g/l de glucose et 50 mg N / l fournis par un mélange d'acides glutamique et aspartique et de sérine auquel on ajoute 3,6 mg/l de chacun des acides aminés aromatiques : tryptophane, phénylalanine et tyrosine qui apportent ainsi un complément de 1 mg N/l.

Enfin, nous avons appliqué les résultats obtenus avec cette espèce à d'autres dermatophytes et il se confirme qu'un équilibre entre la source carbonée et la source azotée est nécessaire à la reproduction sexuée des champignons de ce groupe. Cependant, cet essai a été conduit sans définir à nouveau qualitativement pour chaque espèce l'ensemble des exigences nutritives ; cela explique peut être l'échec partiel enregistré pour plusieurs espèces de Nannizzia, à moins qu'une température de culture non optimale ou une incompatibilité des souches soient les vraies causes de notre échec.

Chez Arthroderma vanbreuseghemii, deux souches semi-compatibles -les périthèces ne se forment qu'en bordure de l'un des thalles- ont produit des périthèces en grand nombre sur le milieu synthétique équilibré alors qu'elles n'en produisaient qu'un petit nombre sur le milieu semi-synthétique proposé par TAKASHIO. Cet essai montre aussi que des facteurs internes interviennent dans la reproduction sexuée d'Arthroderma vanbreuseghemii, et nous sommes maintenant capables de les étudier car nous maîtrisons mieux les facteurs externes.

B I B L I O G R A P H I E

-:-:-:-

- AINSWORTH G.C., SPARROW F.K. & SUSSMAN A.S. — The fungi, an advanced treatise. Volume IV A : a taxonomic review with keys : Ascomycetes and fungi imperfecti. - Academic Press New York and London, 1973.
- AJELLO L. & CHENG S.L. — The perfect state of Trichophyton me tagrophytes. - Sabouraudia, 1967, 5, 230-234.
- ANDRIEU S., BIGUET J., DUJARDIN L. & VAUCELLE T. — Etude antigénique des agents des mycoses profondes par l'analyse comparée des milieux de culture. I. Histoplasma capsulatum et H. duboisii. Relations avec H. farciminosum, Gymnoascus demonbreunii, Blastomyces dermatitidis et Paracoccidioides brasiliensis. - Mycopath. Mycol. appl., 1969, 39, 97-108.
- APINIS A.E. — Revision of british Gymnoascaceae. - Mycol. Pap. 1964, 96, 1-56.
- AUBERT J.P., DUBERT J.M., GROS F. & TAVLITZKI J. — Introduction à la biochimie. - Ediscience / McGraw-Hill, Paris, 1974.
- BERNFELD P. — Biogenesis of natural compounds. - Oxford, London, New York, Paris Pergamon Press, 1963.
- CHADEFAUD M. — Traité de botanique systématique, tome I : les végétaux non vasculaires (Cryptogamie). - Masson et Cie, Paris, 1960.
- COCHRANE V.W. — Physiology of fungi. - Wiley et Sons, Inc. New York, 1958.
- DAVIDSSON M. & UNESTAM T. — Factors affecting the sexual reproduction of a dermatophyte, Arthroderma benhamiae, in synthetic media. - Physiol. Plant., 1974, 31, 237-244.
- DAWSON C.O. & GENTLES J.C. — The perfect stage of Keratinomyces ajelloi Vanbreuseghem, Trichophyton terrestre Durie & Frey and Microsporium nanum Fuentes. - Sabouraudia, 1961, 1, 49-57.

- DAWSON C.O., GENTLES J.C. & BROWN E.M. — Environmental conditions affecting sexual reproduction in species of Arthroderma and Nannizzia. - Sabouraudia, 1964, 3, 245-250.
- DEHORTER B. — Biologie et physiologie de la reproduction sexuée de Nectria galligena Bres. - Thèse Doc. 3ème Cycle, Lille, 1972.
- DE VROEY C. — Formes sexuées des dermatophytes. Production de cleistothèces de Microsporium gypseum (Bodin) Guiart et Grigoraki sur divers milieux stériles. - Ann. Soc. belge Med. trop., 1964, 44, 831-838.
- DROUHET E. — Recherches sur la nutrition des dermatophytes. II. Action des acides aminés sur la croissance et la morphogénèse. - Ann. Inst. Pasteur, 1952, 82, 348-345.
- DROUHET E. & MARIAT F. — Recherches sur la nutrition des dermatophytes. I. Etude des besoins vitaminiques. - Ann. Inst. Pasteur, 1952, 82, 337-347.
- DURAND F. — Sur le développement de la Gymnoascacée, Arachnionotus lectardii J. Nicot. - Bull. Soc. Mycol. Fr., 1969, 85, 321-336.
- ESSER K. — Die Incompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von Podospora anserina (Ces.) Rehm. I. Genetische Analyse der Semi-incompatibilität. - Z. Indukt. Abstamm. u. Verb. L., 1956, 87, 595-624.
- ESSER K. — Heterogenic incompatibility in Incompatibility in Fungi édité par Esser K. et Raper J.R. - Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1965, 6-13.
- ESSER K. & BLAICH R. — Heterogenic incompatibility in plants and animals. - Adv. Genet., 1973, 17, 107-152.
- ESSER K. & KUENEN R. — Genetics of fungi. - Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New-York, 1967.
- FAYRET J. — Action de la température et de la lumière sur la multiplication asexuée et la reproduction sexuelle de Gnomonia leptostyla (Fr.) Ces. et de Not. en culture pure. - C.R. Acad. Sc. Paris, 1967, 265, 1897-1900.
- GHOSH G.R., ORR G.F. & KUEHN H.H. — A new nenus of Gymnoascaceae with a rudimentary peridium. - Mycopath. Mycol. appl., 1963, 21, 36-44.

- HOUIN R., ROUGUET-CAMPANA Y., LE FICHOUX Y., LANCASTRE F., BAZIN J.C., DENIAU M. & BOLOGNINI J. — Isolement de Trichophyton mentagrophytes (Robin) Blanchard 1896, Nannizzia persicolor Stockdale 1967 et Trichophyton terrestre Durie et Frey 1957 du pelage de rongeurs. Essai d'interprétation écologique. - Ann. Parasitol. hum. comp., 1972, 47, 421-429.
- INGOLD C.T. & DRING V.G. — Analysis of spore discharge in Sordaria. - Ann. Bot. London, 1957, 21, 465-477.
- KWON-CHUNG K.J. — Studies on the sexuality of Nannizzia. II. Morphogenesis of gametangia in N. incurvata. - Mycologia, 1969, 61, 593-605.
- KWON-CHUNG K.J. — Genetic study on the incompatibility system in Arthroderma simii. - Sabouraudia, 1972, 10, 74-78.
- KWON-CHUNG K.J. — Emmonsiiella capsulata : perfect state of Histoplasma capsulatum. - Science, 1972 a, 177, 368-369.
- KWON-CHUNG K.J. — Genetics of fungi pathogenic for man. - C.R.C. Crit. Rev. Microbiol. U.S.A., 1974, 3, 115-133.
- LACOSTE L. — Biologie naturelle et culturale du genre Leptosphaeria Cesati et de Notaris. Déterminisme de la reproduction sexuelle. - Thèse de Doctorat ès-Sciences, Toulouse, 1965.
- LEACH M.C. — The qualitative and quantitative relationship of monochromatic radiations to sexual and asexual reproduction of Pleospora herbarum. - Mycologia, 1963, 55, 151-163.
- LOCKWOOD L.B. — Hydrogen ion concentration and ascus formation. - Mycologia, 1937, 29, 289-290.
- McDONOUGH E.S. & LEWIS A.L. — Blastomyces dermatitidis production of sexual stage. - Science, 1967, 156, 528-529.
- McVEIGH I. & MORTON K. — Nutritional studies of Histoplasma capsulatum. - Mycopath. Mycol. appl., 1965, 25, 294-308.
- NANNIZZI A. — Ricerche sull'origine saprofitica dei funghi delle tigne. II. Gymnoascus gypseum sp. n. forma ascofora del Sabouraudites (Achorion) gypseum (Bodin) Ota et Langeron. - Atti. Accad. Fisioser. Siena Sez. med-fis., 1927, 10, 89-97.
- ORR G.F., KUEHN H.H. & PLUNKETT O.A. — Variation in Gymnoascus reessii Baranetzky. - Mycopath. Mycol. appl., 1963, 21, 134-158.

- PADHYE A.A. & CARMICHAEL J.W. — Incompatibility in Microsporium cookei. - Sabouraudia, 1971, 9, 27-29.
- PADHYE A.A., SEKHON A.S. & CARMICHAEL J.W. — Ascocarp production by Nannizzia and Arthroderma on keratinous and non keratinous media. - Sabouraudia, 1973, 11, 109-114.
- STOCKDALE P.M. — Nannizzia incurvata gen. nov., sp. nov., a perfect state of Microsporium gypseum (Bodin) Guiart & Grigorakis. - Sabouraudia, 1961, 1, 41-48.
- STOCKDALE P.M. — Sexual stimulation between Arthroderma simii Stockd., Mackenzie & Austwick and related species. - Sabouraudia, 1968, 6, 176-181.
- TAKASHIO M. — Etude de certains facteurs nutritifs stimulants la reproduction sexuée chez Arthroderma simii Stockdale et al. 1965. - Bull. Acad. royale de Belgique, 1969, 55, 842-852.
- TAKASHIO M. — Etude des phénomènes de reproduction liés au vieillissement et au rajeunissement des cultures de champignons. - Ann. Soc. belge Med. trop., 1973, 53, 427-580.
- VANBREUSEGHEM R. — Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol. - Ann. Soc. belge Med. trop., 1952, 32, 173-178
- VIDON D. — Etude génétique de mutants morphologiques, biochimiques et avirulents chez Arthroderma simii. - Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Paris, 1973.
- WEITZMAN I. — Incompatibility in the Microsporium gypseum complex. - Mycologia, 1964, 56, 425-435.
- WEITZMAN I. & SILVA-HUTNER M. — Non keratineous agar media as substrate for the ascigerous state in certain members of the Gymnoascaceae pathogenic for man and animals. - Sabouraudia, 1967, 5, 360-365.
- WIDRA A. — Ascosporeogenesis by Nannizzia grubyia on a soluble fraction of keratin. - Mycopath. Mycol. appl., 1965, 30, 141-144.
- ZUSSMAN R.A., VICHER E.E. & LYON I. — Nutritional and environmental factors affecting pigmentation in Trichophyton rubrum. - Mycopath. Mycol. appl., 1961, 14, 205-214.

- ZUSSMAN R.A., VICHER E.E. & LYON I. — Aromatic amino acid biosynthesis in Trichophyton rubrum. I. Phenylalanine and Tyrosine biosynthesis. - Mycopath. Mycol. appl., 1967, 32, 194-198.
- ZUSSMAN R.A., VICHER E.E. & LYON I. — Aromatic amino acid biosynthesis in Trichophyton rubrum. II. Failure to detect endogenous shikimic acid and related substances. - Mycopath. Mycol. appl., 1969, 37, 104-108.
- ZUSSMAN R.A., VICHER E.E. & LYON I. — Incorporation of acetate into Trichophyton rubrum Phenylalanine. - Mycopath. Mycol. appl., 1969 a, 37, 86-88.
- ZUSSMAN R.A., VICHER E.E. & LYON I. — Aromatic amino acid biosynthesis in Trichophyton rubrum. III. Exogenous studies : absence of the shikimic acid Pathway. - Mycopath. Mycol. appl., 1970, 42, 1-8.

