

50376
1981
191

N° d'ordre : 939

50376
1981
191

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

(Mention : Biologie du Développement)

par

Patrice MALARD

**CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA PRODUCTION D' α -AMYLASE PAR
ASPERGILLUS ORYZAE (ALHB.) COHN.**



Soutenue le 19 Décembre 1981 devant la Commission d'Examen

J. GUILLAUME	Président
L. LACOSTE	Rapporteur
J. CHEVAUGEON	Examineur
R. DELECOURT	Examineur

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

Furthermore, it is noted that regular audits are essential to identify any discrepancies or errors early on. By conducting these checks frequently, the organization can prevent small mistakes from escalating into larger financial issues.

In addition, the document highlights the need for clear communication between all departments involved in the financial process. This includes the accounting, sales, and procurement teams. Regular meetings and reports can help ensure that everyone is on the same page and that the financial goals are being met.

The second part of the document provides a detailed overview of the current financial status. It includes a summary of the budget for the current period and compares it against the actual performance. This analysis shows that while there have been some areas of overspending, overall the organization is staying within its financial constraints.

Key areas of focus for the next quarter include reducing operational costs and increasing revenue through new market expansion. The document outlines specific strategies for each of these goals, such as renegotiating contracts with suppliers and launching targeted marketing campaigns.

Finally, the document concludes with a strong emphasis on the importance of staying agile and responsive to market changes. The financial team is committed to providing regular updates and reports to the management, ensuring that the organization is always well-informed and prepared to take action when needed.

The document is signed by the Chief Financial Officer, who is responsible for the accuracy and integrity of the information presented.

A V A N T - P R O P O S

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Cryptogamie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, avec le concours de la Société RAPIDASE.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur LACOSTE, Directeur du laboratoire de Cryptogamie, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour les conseils toujours judicieux qu'il a su me prodiguer lors de la rédaction de ce Mémoire. Qu'il trouve ici le témoignage de mon respectueux attachement.

Monsieur le Professeur GUILLAUME a bien voulu me faire l'honneur de présider le Jury de cette Thèse. Je l'en remercie très vivement.

Ma reconnaissance va également à Monsieur le Professeur CHEVAUGEON de l'Université Paris XI dont j'ai toujours apprécié les conseils bienveillants. Je lui sais gré, par ailleurs, de m'avoir introduit auprès de personnes telles que Mademoiselle ZYCKLER, Madame PARISOT, Madame DABOUSSI qui m'ont fait profiter d'une partie de leurs connaissances.

Je remercie également Monsieur DELECOURT, Directeur Scientifique de la Société RAPIDASE, pour l'aide matérielle qu'il a bien voulu m'accorder au long de ce travail. Il m'est agréable ici de lui témoigner ma profonde gratitude.

Enfin, je ne saurais oublier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce Mémoire. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma chaleureuse reconnaissance.

S O M M A I R E

INTRODUCTION	1
--------------------	---

CHAPITRES PRELIMINAIRES

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES GENERALES

I. Origine des souches d' <i>Aspergillus oryzae</i>	5
II. Production d' α -amylase en culture.....	6
1) conditions culturelles.....	6
2) dosage de l'activité.....	6
3) mesure de la croissance.....	7
III. Mutagenèse et sélection de mutants.....	7
IV. Méthode de clonage.....	11

CHAPITRE II : CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES D'ASPERGILLUS ORYZAE

I. Caractères généraux.....	13
1) son intérêt dans l'industrie de la fermentation.....	13
2) position systématique.....	14
3) variabilité.....	16
4) recombinaison génétique.....	16
II. Caractéristiques morphologiques et culturelles des souches BrBv IV et 1135.....	17
1) aspect des souches en culture.....	17
2) étude de la sectorisation.....	20
a) contenu en noyaux des conidies	
b) clonages	
3) discussion.....	24

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DE LA BIOSYNTHESE D' α -AMYLASE CHEZ LES SOUCHES BRBV IV ET 1135

Introduction.....	29
I. Revue bibliographique.....	30
1) influence des constituants du milieu de culture sur la biosynthèse d' α -amylase.....	30
<i>a) la source de carbone</i>	
<i>b) la source d'azote</i>	
<i>c) les éléments minéraux</i>	
2) les mécanismes régulateurs de la biosynthèse.....	33
3) discussion.....	35
II. Etude physiologique en cultures agitées.....	36
1) comportement des souches sur le milieu de référence.....	37
<i>a) résultats</i>	
<i>b) discussion</i>	
2) comportement des souches sur Czapek additionné d'extrait de levure.....	43
3) influence du glucose et du maltose sur la biosynthèse d' α -amylase.....	46
<i>a) influence du glucose</i>	
<i>b) influence du maltose</i>	
<i>c) résultats et discussion</i>	
4) détermination du rapport entre α -amylase intracellulaire et extracellulaire.....	54
<i>a) discussion</i>	
<i>b) conclusion</i>	
III. Obtention des protoplastes chez <i>Aspergillus oryzae</i>	56
1) revue bibliographique.....	56
<i>a) le complexe lytique</i>	
<i>b) les autres conditions affectant le rendement en protoplastes</i>	
2) résultats expérimentaux.....	58
<i>a) préparation du complexe lytique</i>	
<i>b) activité du filtrat de <i>T. harzianum</i> sur <i>A. oryzae</i></i>	
<i>c) stabilité et régénération des protoplastes</i>	
3) conclusion.....	62
IV. Etude physiologique sur protoplastes.....	63
1) protocole expérimental général.....	63
2) étude de la production d' α -amylase sur le milieu de référence.....	64
3) action de la 6-méthyl purine sur la biosynthèse d' α -amylase.....	67
4) efficacité comparée du glucose, du maltose et de l'iso-maltose sur la biosynthèse d' α -amylase.....	69
<i>a) protocole expérimental</i>	
<i>b) résultats et discussion.</i>	
DISCUSSION.....	75

CHAPITRE II : RECHERCHE D'UN POLYMORPHISME EVENTUEL DE L' α -AMYLASE

Introduction.....	79
I. Données bibliographiques.....	80
II. Protocole expérimental.....	80
1) conditions générales de l'électrophorèse.....	80
2) mise en évidence de l'activité α -amylase par zymogramme.....	81
3) préparation des échantillons.....	81
III. Résultats expérimentaux.....	82
1) rendements et activités spécifiques.....	82
2) électrophorèses.....	83
<i>a) dépôt d'échantillons</i>	
<i>b) résultats</i>	
CONCLUSION.....	85

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE I : HETEROCARYOSE ET RECOMBINAISON MITOTIQUE

Introduction.....	89
I. Hétérocaryose.....	90
1) les mutants.....	90
2) réalisation des anastomoses.....	93
3) étude des secteurs prototrophes.....	96
<i>a) stabilité des hétérocaryons</i>	
<i>b) analyse des conidies de première et quatrième générations</i>	
4) discussion.....	101
II. Fusions nucléaires et recombinaison à la mitose.....	104
1) obtention du stade diploïde.....	104
2) distribution nucléaire chez les diploïdes.....	107
3) obtention de clones recombinés.....	109
<i>a) protocole expérimental</i>	
<i>b) résultats expérimentaux</i>	
4) discussion.....	112
CONCLUSION.....	112

CHAPITRE II : FUSION DE PROTOPLASTES

Introduction.....	116
-------------------	-----

I. Les conditions affectant la fusion : Revue bibliographique.....	118
1) influence de la concentration en PEG sur la fréquence de fusion.....	118
2) influence du pH et de la concentration en ions Ca ⁺⁺ sur la fréquence de fusion.....	119
3) les autres paramètres.....	120
II. Etude expérimentale.....	121
1) protocole général.....	121
2) utilisation d'une solution fusiogène type.....	121
3) étude de différentes concentrations en PEG.....	123
4) influence de la conservation de protoplastes sur leur fusion	124
5) essais de fusion sur différents croisements.....	126
6) influence du pH et des ions Ca ⁺⁺	127
CONCLUSION.....	129

CONCLUSION GENERALE

BIBLIOGRAPHIE

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

Les enzymes sont aujourd'hui un outil indispensable dans de nombreux secteurs d'activités, aussi divers que le textile, la brasserie, la fabrication de jus de fruit ou encore celle du fromage. Afin de répondre aux exigences d'un marché en progression constante, la recherche industrielle est principalement orientée vers l'optimisation des taux de production. A l'origine, l'utilisation des seules enzymes d'extraction telles la présure de veau ou la β -amylase du malt ne laissait que peu de place à l'amélioration des rendements. Par contre, dès la mise en évidence des potentialités considérables qu'offraient les micro-organismes dans ce domaine, l'ensemble des méthodologies relevant de la microbiologie, de la génétique, de la physiologie et de la biochimie ont pu être employées à cette fin.

Toutefois, dans de nombreux cas, les mécanismes qui régissent la biosynthèse d'une enzyme donnée demeurent mal connus. A l'évidence, cette question se pose pour n'importe quel type d'enzymes et n'est pas limitée aux seules d'intérêt industriel, mais pour ces dernières la nécessité de les produire en quantité rend le problème plus crucial.

C'est pour cette raison que la Société RAPIDASE nous a confié l'étude des facteurs intervenant dans la biosynthèse d' α -amylase chez *Aspergillus oryzae*.

De par son importance industrielle, cette enzyme a fait l'objet de nombreux travaux depuis une vingtaine d'années. Cependant, la diversité des méthodes d'études, ainsi que des souches utilisées, ne semblait pas conduire à l'élaboration d'un schéma général pour sa synthèse et sa régulation. Aussi nous a-t-il paru essentiel d'envisager ici une analyse comparative, entre 2 souches dont les aptitudes à biosynthétiser cette enzyme différaient très fortement.

Pour cela, deux voies d'approche seront suivies. Dans une première partie nous traiterons de l'aspect physiologique de la biosynthèse d' α -amylase en nous attachant à la recherche des caractéristiques propres à chacune des souches étudiées. Dans une seconde partie, nous envisagerons la recombinaison génétique de ces souches afin de voir, d'une part, dans quelles mesures le caractère "production d' α -amylase" peut être recombiné, d'autre part, si un lien existe entre la physiologie de ces nouveaux clones et leur aptitude à biosynthétiser cette enzyme.

CHAPITRES

PRELIMINAIRES

CHAPITRE I :

MATERIEL ET METHODES GENERALES.

I. ORIGINE DES SOUCHES D'ASPERGILLUS ORYZAE

Les deux souches utilisées dans cette étude nous ont été fournies par la Société RAPIDASE sous référence BrBv IV et 1135. Il s'agit de souches anciennement employées en fermentation pour la production d' α -amylase et n'ayant entre elles aucun lien de parenté.

Au laboratoire, leur entretien s'effectue en tubes 25/200 contenant 20 ml de milieu nutritif gélosé. Nous avons retenu deux milieux de culture à cet effet :

- le milieu de Czapek modifié par remplacement du phosphate dipotassique par le monopotassique. Il nous a servi à la conservation des souches.

Composition :

- saccharose..... 30 g
- NaNO_3 3 g
- KH_2PO_4 1 g
- $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g
- KCl 0,5 g
- $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g
- Eau distillée..... 1000 ml

pH avant stérilisation amené à 6.

- le milieu de YABUKI et coll. (1977) auquel nous avons eu recours lorsqu'une sporulation abondante était recherchée.

Composition : - malt..... 3 g
 - extrait de levure..... 3 g
 - néopeptones (Difco)..... 5 g
 - glucose.....10 g
 - eau distillée.....1000 ml
 pH avant stérilisation amené à 5,5.

II. PRODUCTION D' α -AMYLASE EN CULTURE

1) CONDITIONS CULTURALES

La production d' α -amylase s'effectue en fioles d'Erlenmeyer de 1 litre contenant 200 ml de milieu liquide. Afin de se rapprocher des conditions de la fermentation industrielle, l'incubation se fait sur une table à agitation Biolafitte à 140 tr/mn et à 30°C.

L'ensemencement des fioles de culture est réalisé de la façon suivante. A un tube de milieu au malt (YABUKI) âgé de 10 jours, on ajoute 10 ml d'eau distillée stérile. Après grattage de la surface et homogénéisation de la suspension, les conidies sont séparées des débris mycéliens par filtration sur coton de verre. La densité de la suspension est alors évaluée à l'hématimètre puis amenée à 10^5 conidies par ml. 1 ml de cette suspension est ajouté à chacune des fioles.

2) DOSAGE DE L'ACTIVITE

L' α -amylase étant une enzyme extracellulaire, le dosage de l'activité est effectué sur les filtrats cultureux. Pour cela, nous avons employé une méthode automatique sur un appareil TECHNICON modèle AUTOANALYSEUR II. Le principe de ce dosage est de mesurer spectrophotométriquement l'apparition de fonctions réductrices, libérées par l'hydrolyse d'une solution d'amidon sous l'action de l'enzyme. Le composé subissant la réduction est dans ce cas le ferricyanure de potassium qui se décolore à 90°C en présence de groupements réducteurs. La lecture se fait à 440 nm et l'activité est exprimée en unité de pouvoir saccharifiant (PS 50) par millilitre par rapport à un témoin enzymatique de titre connu.

3) MESURE DE LA CROISSANCE

La croissance est mesurée par la méthode des poids de matière sèche et exprimée en grammes par litre de milieu de culture. Pour cela nous avons procédé de la façon suivante. Le contenu de chaque fiole est filtré sous vide sur un filtre DURIEUX n° 111 sans cendres et placé dans une boîte à tare dont le poids ainsi que celui du filtre ont été préalablement déterminés après passage à 105°C pendant 24 heures, puis refroidissement dans un dessiccateur.

Après un nouveau passage à l'étuve à 105°C, pendant 24 heures, puis un refroidissement dans les mêmes conditions, l'ensemble boîte, filtre et mycélium sec est alors pesé et le poids de matière sèche calculé par différence. Pour chaque expérimentation, la moyenne de trois fioles de culture a été prise comme valeur finale.

III. MUTAGENÈSE ET SÉLECTION DE MUTANTS

Notre intérêt s'étant porté vers la recherche de mutants auxotrophes, nous avons procédé de la façon suivante. Les conidies d'*Aspergillus oryzae* sont récupérées sur des cultures âgées de 10 jours, mises en suspension dans de l'eau distillée stérile et séparées des débris mycéliens par filtration sur coton de verre. Elles sont soumises alors à une irradiation sous lumière ultraviolette pendant 10 minutes, conduisant à un taux de survie d'environ 1 %. Après irradiation, la suspension mutagénisée est maintenue à l'obscurité et subit une étape d'enrichissement en mutants sur milieu minimum liquide (Czapek) pendant 24 heures à 30°C et sous obscurité continue. Cette étape a pour but l'élimination des conidies restées sauvages après mutagenèse qui pourront germer sur ce milieu et que l'on séparera des spores mutantes par simple filtration sur coton de verre. La suspension enrichie est alors étalée sur milieu complet (Czapek additionné de 5 g/l d'extrait de levure) contenant 0,08 % de désoxycholate de sodium afin de réduire la taille des colonies.

Après incubation, ces colonies sont transférées sur milieu minimum et seuls sont retenus les clones incapables de croître sur ce milieu. Afin de déterminer le type d'auxotrophie qu'ils portent, ils sont à nouveau transférés sur une gamme de milieux d'identification selon le schéma indiqué dans les tableaux 1, 2 et 3 puis caractérisés à l'aide de la clé donnée dans le tableau 4.

Tableau 1 : Premier transfert sur milieux différentiels.

MA	MB
Czapek.....1000 ml	Czapek..... 1000 ml
Hydrolysats de caséine sans vitamines (DIFCO)..... 5 g	Thiamine-HCl..... 100 µg
Thiamine-HCl..... 100 µg	Biotine..... 5 µg
Biotine..... 5 µg	Pyridoxine..... 100 µg
Pyridoxine..... 100 µg	Adénine..... 20 mg
Adénine..... 20 mg	Thymine..... 20 mg
Thymine..... 20 mg	Guanine..... 20 mg
Guanine..... 20 mg	Cytosine..... 20 mg
Cytosine..... 20 mg	
MC	MD
Czapek.....1000 ml	Czapek..... 1000 ml
Hydrolysats de caséine sans vitamines (DIFCO)..... 5 g	Hydrolysats de caséine sans vitamines (DIFCO)..... 5 g
Adénine..... 20 mg	Thiamine..... 100 µg
Thymine..... 20 mg	Biotine..... 5 µg
Guanine..... 20 mg	Pyridoxine..... 100 µg
Cytosine..... 20 mg	

Tableau 2 : Deuxième transfert sur milieux d'identification pour mutants requérant des acides aminés.

A1	A2	A3
Czapek..... 1000 ml l-glycocolle..... 100 mg Alanine..... 100 mg d-l-Valine..... 100 mg	Czapek..... 1000 ml d-l-Leucine..... 100 mg d-l-Isoleucine.. 100 mg d-l-Méthionine.. 100 mg	Czapek..... 1000 ml d-l-Phénylalanine. 100 mg l-tyrosine..... 100 mg l-Tryptophane..... 100 mg
A4	A5	A6
Czapek..... 1000 ml d-l-Sérine..... 100 mg d-l-Thréonine..... 100 mg l-Cystéine..... 100 mg	Czapek..... 1000 ml l-Asparagine.... 100 mg l-Glutamine..... 100 mg l-Lysine..... 100 mg	Czapek..... 1000 ml l-Arginine-HCl.... 100 mg d-l-Histidine..... 100 mg l-Hydroxyproline.. 100 mg
A7	A8	A9
Czapek..... 1000 ml l-Glycocolle..... 100 mg d-l-Leucine..... 100 mg d-l-Phénylalanine. 100 mg d-l-Sérine..... 100 mg l-Asparagine..... 100 mg l-Arginine..... 100 mg	Czapek..... 1000 ml Alanine..... 100 mg d-l-Isoleucine.. 100 mg l-tyrosine..... 100 mg d-l-Thréonine... 100 mg l-Glutamine..... 100 mg d-l-Histidine... 100 mg	Czapek..... 1000 ml d-l-Valine..... 100 mg d-l-Méthionine.... 100 mg l-tryptophane..... 100 mg l-Cystéine..... 100 mg l-Lysine..... 100 mg l-Hydroxyproline.. 100 mg

Tableau 3 : Deuxième transfert sur milieux d'identification pour mutants requérant des bases ou des vitamines.

Bases	Vitamines
Czapek 1000 ml + adénine ou guanine ou cytosine ou thymine	Czapek 1000 ml + thiamine 100 µg ou biotine 5 µg ou pyridoxine 100 µg



Tableau 4 : Clé de détermination des auxotrophies*- Premier transfert*

<i>Croissance sur milieux</i>	<i>Besoins</i>
<i>MA - MB - MC</i>	<i>Bases</i>
<i>MA - MB - MD</i>	<i>Vitamines</i>
<i>MA - MC - MD</i>	<i>Acides aminés</i>

- Deuxième transfert

<i>Croissance sur milieux</i>	<i>Besoins</i>
<i>A1 et A7 seuls</i>	<i>l-Glycocolle</i>
<i>A2 et A7 seuls</i>	<i>d-l-Leucine</i>
<i>A3 et A7 seuls</i>	<i>d-l-Phénylalanine</i>
<i>A4 et A7 seuls</i>	<i>d-l-Sérine</i>
<i>A5 et A7 seuls</i>	<i>l-Asparagine</i>
<i>A6 et A7 seuls</i>	<i>l-Arginine</i>
<i>A1 et A8 seuls</i>	<i>Alanine</i>
<i>A2 et A8 seuls</i>	<i>d-l-Isoleucine</i>
<i>A3 et A8 seuls</i>	<i>l-Tyrosine</i>
<i>A4 et A8 seuls</i>	<i>d-l-Thréonine</i>
<i>A5 et A8 seuls</i>	<i>l-Glutamine</i>
<i>A6 et A8 seuls</i>	<i>d-l-Histidine</i>
<i>A1 et A9 seuls</i>	<i>d-l-Valine</i>
<i>A2 et A9 seuls</i>	<i>d-l-Méthionine</i>
<i>A3 et A9 seuls</i>	<i>l-Tryptophane</i>
<i>A4 et A9 seuls</i>	<i>l-Cystéine</i>
<i>A5 et A9 seuls</i>	<i>l-Lysine</i>
<i>A6 et A9 seuls</i>	<i>l-Hydroxyproline</i>



La conservation des souches mutantes s'est faite sur le milieu au malt de YABUKI qui a permis de suppléer aux différents types d'auxotrophies obtenus. Bien que la stabilité des mutations induites par le rayonnement ultraviolet ait été généralement bonne, les mutants ont subi périodiquement un isolement monoconidien afin de préserver leur caractère d'auxotrophie.

IV. MÉTHODE DE CLONAGE

Pour certaines expérimentations, il s'est avéré nécessaire de réaliser des isolements monosporés avec certitude. La méthode que nous avons alors utilisée est la suivante. Après dilution d'une suspension initiale, 100 à 150 spores sont étalées sur milieu complet (Czapek additionné de 5 g/l d'extrait de levure) contenant 3 % d'Agar. Après une prégermination de 12 à 14 heures à 30°C elles ont émis un tube germinatif principal et sont alors parfaitement visibles sous la loupe binoculaire à un grossissement x 100. Il suffit ensuite de découper autour de chaque spore un petit carré de gélose à l'aide d'un microscalpel et de le transférer sur le milieu de culture désiré.

CHAPITRE II :

CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES D'ASPERGILLUS ORYZAE.

I. CARACTÈRES GÉNÉRAUX

1) SON INTERET DANS L'INDUSTRIE DE LA FERMENTATION

Alors que le monde occidental n'a pas reconnu dans les Champignons une source d'alimentation potentielle, sans doute à cause d'un régime alimentaire par ailleurs fortement varié, il n'en est pas de même en Orient où très tôt ils ont contribué à diversifier des habitudes nutritionnelles, principalement végétariennes. Aussi n'est-il pas surprenant que dans cette partie du globe, leurs aptitudes à biotransformer la matière végétale brute aient été anciennement mises en évidence et domestiquées.

C'est sans doute par le jeu d'une sélection empirique que certaines espèces capables de produire en quantité des hydrolases extracellulaires ont été privilégiées. Parmi elles *Aspergillus oryzae* tient une place prépondérante dans les fermentations traditionnelles orientales. Son utilisation principale est la préparation du "KOJI" que l'on peut rapprocher dans une certaine mesure de notre malt occidental. Il est obtenu par l'hydrolyse enzymatique sous l'action du Champignon, d'un mélange complexe, composé généralement de farines de riz de blé ou d'orge ainsi que de haricots. Après une incubation d'environ 3 jours dans des conditions définies, le "KOJI" ainsi préparé va subir directement une double fermentation lactique d'abord, alcoolique ensuite. Différents produits peuvent

être élaborés à partir de ce schéma général (revue dans WOOD, 1977). Ils dépendent à la fois de la composition du mélange initial, des souches utilisées pour l'ensemencement et des conditions de fermentation. Les deux principaux, par leur importance économique, sont la "SOY-SAUCE" d'une part et le "SAKE" ou vin de Riz d'autre part. Pour sa fabrication, le Saké nécessite un Koji préparé uniquement à partir de riz et devant posséder rapidement une quantité importante de sucres. Cette contrainte a permis la sélection de souches à titres élevés en α -amylases, alors qu'au contraire pour la Soy-Sauce se sont essentiellement des activités protéolytiques qui ont été sélectionnées.

En Occident, *Aspergillus oryzae* n'est pratiquement employé que pour la production d' α -amylase qui trouve son application dans divers domaines. L'industrie boulangère s'en sert pour suppléer aux déficiences du blé en amylase lors de la panification. En cela elle se trouve être supérieure à l' α -amylase bactérienne ou à l'amylase du malt de par son absence de protéase et sa faible température d'inactivation. Un second débouché important est celui de l'industrie de l'amidon où elle contribue, avec l'amyloglucosidase d'*Aspergillus niger*, à la préparation de sirops à haute conversion en maltose.

2) POSITION SYSTEMATIQUE

Aspergillus oryzae est un Ascomycète imparfait appartenant à l'ordre des Mucédinales, famille des *Mucedinaceae*, sous-famille des *Aspergillaceae*. En culture sur les différents milieux que nous avons utilisés, il forme un mycélium blanchâtre à croissance rapide s'enfonçant assez profondément dans la gélose. Ce mycélium est constitué d'hyphes cloisonnés à intervalles irréguliers, isolant ainsi des articles plurinucléés. Cependant, la présence de pores permet la communication entre les articles et confèrent au mycélium un fonctionnement coenocytique.

Sur ces hyphes prennent naissance des conidiophores dressés, eux-mêmes cloisonnés. Comme pour toutes les autres espèces du genre, ils se terminent par une vésicule très renflée sur laquelle bourgeonneront des phialides, cellules sporogènes. Chez *A. oryzae*, cette vésicule est en forme de massue et peut supporter soit directement les phialides, soit un ou deux rangs de stérigmates qui, à leur tour, porteront une ou deux rangées de phialides (ISHITANI et SAKAGUCHI, 1955b).

La différenciation des conidies est du type basipète. Lorsque la phialide a émis une première spore, un second bourgeonnement se produit à un

niveau inférieur isolant ainsi une nouvelle conidie. Chez *A. oryzae* on observe rarement de longues chaînes de conidies. Généralement dès leur formation elles se détachent de la phialide, tout au plus peut-on voir deux ou trois spores encore soudées l'une à l'autre.

La forme des conidies est globuleuse à elliptique et leur paroi plus ou moins ornementée. En masse elles donnent une coloration allant du jaune clair à l'origine au vert foncé dans la spore adulte. D'un diamètre variant de 3 à 10 μ elles sont d'autre part plurinucléées. ISHITANI et SAKAGUCHI (1955a) rapportent que dans certaines souches on peut compter jusqu'à 20 noyaux par conidie, cependant dans la plupart des cas ce nombre n'excède pas la dizaine. Pour ces auteurs, la jeune conidie recevrait deux noyaux et des mitoses successives conduiraient à l'état nucléaire définitif de la spore adulte.

- le groupe *Flavus-Oryzae* :

Dans leur "Manual of the Aspergilli", THOM et RAPER (1945) indiquent que la détermination précise de l'espèce *Aspergillus oryzae* est délicate. D'après ces auteurs, il semble exister une variation continue entre la souche décrite à l'origine par COHN en 1884 et *A. flavus*, les stades intermédiaires étant représentés par les souches d'origine orientale servant traditionnellement dans les fermentations. Pour ces auteurs, la souche de COHN émet des conidiophores longs mais sporule assez faiblement. Au contraire, les souches industrielles ont une sporulation généralement plus abondante et portée par des conidiophores courts se rapprochant ainsi de l'espèce *Flavus*. L'ambiguïté de cette détermination, vient essentiellement du fait que les souches se rapprochant morphologiquement de celle décrite par COHN sont minoritaires parmi les isolats naturels. Aussi, les auteurs japonais ont-ils basé leur classification sur les seules souches industrielles qu'ils désignent sous le terme général de "Koji-molds". SAKAGUCHI et YAMADA (1945), après avoir étudié plusieurs centaines de souches, ont introduit une nouvelle espèce, *Aspergillus sojae*, qu'ils différencient d'*Aspergillus oryzae* selon trois critères :

- la texture de la paroi conidienne (rugueuse ou lisse) ;
- la texture des conidiophores (rugueuse ou lisse) ;
- la taille des conidies.

D'après cette classification, *Aspergillus oryzae* apparaît comme ayant des conidies lisses ou rugueuses et des conidiophores rugueux alors qu'*Aspergillus sojae* possède des conidies échinulées et des conidiophores lisses. Pour ces auteurs, la taille des conidies est surtout utile à la séparation de différentes variétés dans l'espèce *A. oryzae*. On a ainsi :

- *A. oryzae* var. *microsporus* (conidies $< 6 \mu$) ;
- *A. oryzae* sensu-stricto (conidies 6 à 8μ) ;
- *A. oryzae* var. *magnasporus* (conidies $> 8 \mu$).

3) VARIABILITE

Outre les difficultés que l'on peut rencontrer à la détermination précise de cette espèce, il semble que morphologiquement de nombreux isolats soient instables. Cette instabilité se traduit par la présence de secteurs à sporulation abondante prenant naissance à un moment quelconque de la croissance. Bien que ce phénomène puisse se rencontrer chez d'autres espèces, l'ampleur qu'il atteint chez *A. oryzae* a poussé ISHITANI et SAKAGUCHI (1955a) vers l'étude de son déterminisme.

Ces auteurs ont remarqué que les souches stables se répartissaient en deux groupes, celles dont la sporulation était abondante et qu'ils nomment type conidien (type C) et celles dont la sporulation était faible qu'ils nomment type mycélien (type M). Les souches présentant une sectorisation seraient alors le fruit d'associations hétérocaryotiques entre homotypes distincts M et C. Partant de cette hypothèse, ils ont entrepris d'étudier les souches instables par clonage monospore pendant plusieurs générations, afin de voir si une ségrégation des caractères M et C apparaissait et si les homotypes ségréants étaient stables. Les résultats obtenus par ces auteurs montrent qu'une ségrégation des caractères se produit mais cependant que les homotypes ségréants ne demeurent pas stables car, conservés 6 mois à température ambiante, ils donnent à nouveau naissance, après repiquage, à des souches fortement sectorisées. Les auteurs ont toutefois conclu au maintien d'une hétérocaryose pour la sectorisation, car lors de croisements faisant intervenir deux souches stables M et C, des clones fortement sectorisés apparaissent.

4) RECOMBINAISON GENETIQUE

Peu de travaux ont été menés sur l'aptitude à la recombinaison nucléaire chez cette espèce. Il semble acquis toutefois qu'un cycle sexué n'existe pas et que seule l'intervention de mécanismes parasexuels puisse conduire à l'apparition de génotypes nouveaux résultant de recombinaisons. Cependant,

aucune étude ne permet de connaître l'importance réelle qu'occupe la parasexualité, dans la diversification des populations naturelles. Les seuls travaux ayant trait à l'étude de ces phénomènes sont ceux d'ISHITANI et SAKAGUCHI (1955a,b,c,d - 1956a,b) qui ont mis en évidence les différentes étapes de ce cycle et les modalités de sa réalisation. Plus tardivement, THORBEC et EPLOV (1974), s'intéressant à la production d' α -amylase par des hétérocaryons et des diploïdes de cette espèce, ont repris dans ses grandes lignes la méthodologie décrite par les auteurs précédents.

A notre connaissance, se sont là les seuls travaux réalisés à ce jour qui laissent penser qu'une recombinaison génétique n'est pas impossible chez *Aspergillus oryzae*.

II. CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET CULTURALES DES SOUCHES BRBV IV ET 1135

1) ASPECT DES SOUCHES EN CULTURE

Sur les 3 milieux que nous avons employés, à savoir Czapek avec ou sans extrait de levure et milieu au malt, les souches sont très facilement reconnaissables.

En premier lieu, la souche BrBv IV sectorise abondamment sur tous ces milieux, alors que nous n'avons jamais remarqué le moindre signe de sectorisation pour la souche 1135. Comme on peut le voir sur les planches 1 et 2, les secteurs sont matérialisés par des zones à sporulation abondantes prenant naissance à un moment quelconque de la croissance. A leurs côtés, le mycélium est pratiquement stérile, ne donnant que de rares conidiophores le plus souvent de formes aberrantes.

La couleur et la densité de la sporulation sont également des facteurs qui les séparent. La souche 1135 sporule toujours plus faiblement que la souche BrBv IV sauf sur Czapek où cette dernière ne donne qu'un mycélium peu abondant et de rares secteurs sporulés. Sur les deux autres milieux et en particulier sur malt, la sporulation est intense pour cette souche alors qu'elle

Planche 1 : Aspect des souches BrBv IV et 1135 sur Czapek additionné d'extrait de levure (isolement monospore).



LILLE

Planche 2 : Différents types morphologiques obtenus par clonage de la souche BrBv IV.



reste à un niveau moyen pour la souche 1135. Lorsque les conidies sont encore jeunes, leur couleur est très différente selon la souche, vert clair pour la souche 1135 et jaune d'or pour la souche BrBv IV. Toutefois, à maturité elles deviennent vert foncé pour les deux souches et ont tendance à brunir en vieillissant.

En culture monospore, le diamètre des colonies s'accroît rapidement d'environ 10 mm/jour, sur Czapek additionné d'extrait de levure. Cependant, une étude réalisée sur 50 spores de chaque souche a montré que la variance du diamètre journalier était très différente d'une souche à l'autre et permettait à coup sûr de séparer les deux populations. Le tableau ci-dessous regroupe les valeurs de diamètre moyen et de variance après 4, 5 et 6 jours de culture et la valeur du F de SNEDECOR utilisée pour l'analyse des variances.

Tableau 5 : Diamètre moyen des colonies (\bar{x}) et variances (σ^2) pour 50 spores de chaque souche mises en culture sur Czapek additionné d'extrait de levure, après 4,5 et 6 jours d'incubation à 30°C.

	4ème jour		5ème jour		6ème jour	
	\bar{x}	σ^2	\bar{x}	σ^2	\bar{x}	σ^2
BrBv IV	3,07	0,08	3,98	0,08	5,08	0,08
1135	3,21	0,01	4,17	0,03	5,66	0,03
$F = \frac{\sigma^2 \text{ BrBv IV}}{\sigma^2 \text{ 1135}}$		8		2,66		2,66

Valeur de F au seuil de 5 % pour $\nu = \nu' = 49$ ddl $\approx 1,50$

Le fait qu'une variance plus importante apparaisse pour la souche BrBv IV s'explique par l'aspect sectorisé de sa croissance. On remarque en effet que le contour des colonies est plus ou moins festonné, ceci étant dû au développement de secteurs à croissance sensiblement plus rapide qui correspondront plus tard aux secteurs de sporulation. Ce phénomène n'est cependant pas général dans le sens où la présence de secteurs de sporulation n'implique pas nécessairement l'existence de secteurs de croissance, par contre l'inverse a toujours pu être vérifié.

Nous avons porté un intérêt particulier à l'étude de la sectorisation de cette souche car certaines observations faites par la Société RAPIDASE puis par DEPRES (1977) au laboratoire, laissaient penser qu'une relation existait entre la morphologie des clones et la production d' α -amylase. En particulier l'augmentation de la sectorisation semblait se traduire par une perte notable d'activité. Bien que les résultats d'ISHITANI et SAKAGUCHI (1955a) n'aient pas clairement montré qu'une stabilisation des caractères puisse être obtenue par clonage monospore, nous avons toutefois utilisé cette méthodologie après avoir déterminé la distribution nucléaire dans les conidies de cette souche.

2) ETUDE DE LA SECTORISATION

a) Contenu en noyaux des conidies :

Si la sectorisation résulte effectivement du maintien dans les cellules d'un stade hétérocaryotique, l'obtention de clones stables sera d'autant plus rapide que le nombre de noyaux contenu dans les spores sera plus faible. Aussi la connaissance de la distribution nucléaire existant dans les conidies est-elle primordiale dans cette étude. Afin d'avoir un élément de comparaison, les deux souches ont été soumises à cette même investigation.

- *Protocole expérimental* : Nous avons utilisé la technique décrite par ZYCKLER (1973) pour la coloration des noyaux chez les Ascomycètes. Elle offre l'avantage de donner à la fois un bon contraste et un cytoplasme transparent.

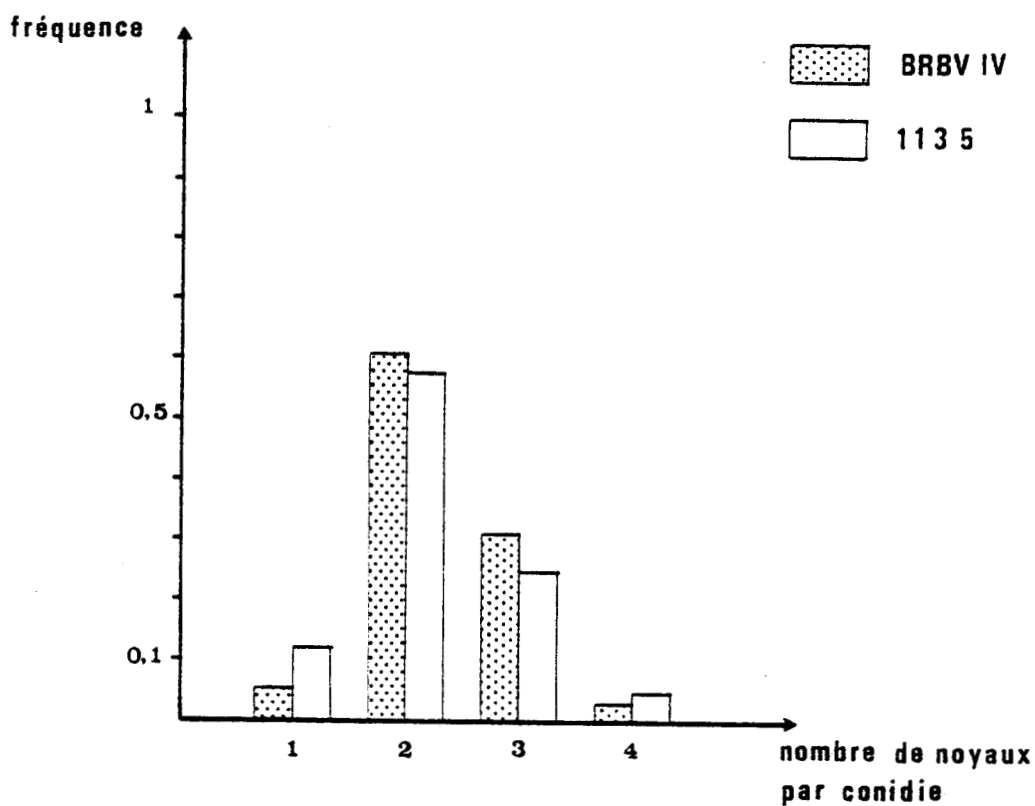
Le fixateur : il est composé de 9 parts de Butanol-1, de 6 parts d'acide acétique glacial et de 2 parts d'acide chromique à 2 %. Il doit être préparé extemporanément, la qualité de fixation étant moins bonne après quelques heures. Le mycélium est recueilli sur boîte de Pétri par grattage et fixé. La durée optimum de fixation est d'environ 8 jours, mais les échantillons peuvent être conservés plusieurs mois.

La coloration : le matériel fixé subit une hydrolyse dans l'HCl normal à 70°C pendant 10 minutes. L'hydrolyse est brutalement stoppée par refroidissement dans la glace. Un fragment du matériel est déposé sur une lamme et soigneusement séché afin d'éliminer l'excès d'acide chlorhydrique qui nuit à la coloration. On dépose ensuite 1 goutte d'acétate de Fer préparé par dilution au 1/10ème d'une solution saturée dans l'acide acétique à 45 %, puis à côté, deux gouttes d'hématoxyline (Merck) à 2 % dans l'acide propionique à 45 %. On mélange ensuite

Tableau 6 : Nombre moyen de noyaux par conidie et diamètre moyen d'une conidie.

	Br Bv IV	1135
Nombre moyen de noyaux/conidie	$\bar{N} = 2,34 \pm 0,1$	$\bar{N} = 2,21 \pm 0,12$
Diamètre moyen d'une conidie (μ)	$\bar{D} = 4,68 \pm 0,06$	$\bar{D} = 4,8 \pm 0,1$

Planche 3 : Distribution nucléaire dans les conidies des souches BrBv IV et 1135.



rapidement les deux solutions. Après mise en place de la lamelle, la préparation est passée quelques instants sur la veilleuse d'un bec Bunzen afin d'accentuer la coloration puis observée au microscope.

- *Résultats* : Comme on peut le remarquer sur le tableau 6, des valeurs assez comparables ont été observées pour les deux souches, puisque le nombre moyen de noyaux par conidie ainsi que le diamètre moyen d'une conidie, sont assez proches. L'observation de la planche 3 indique là encore de grandes similitudes puisque dans les deux cas, la majorité des conidies possèdent deux noyaux.

b) Clonages :

Nous avons réalisé les clonages selon la technique décrite au chapitre I "matériel et méthode". Seul le milieu de Czapek supplémenté avec 5 g/l d'extrait de levure a été utilisé. Il nous a servi à la fois pour les clonages et pour la conservation de certaines souches durant l'expérimentation.

La classification des types morphologiques rencontrés a été basée sur la présence ou l'absence de sectorisation. Nous n'avons pas introduit de critère quantitatif sur l'abondance des secteurs sporulés par rapport au mycélium environnant comme l'ont fait ISHITANI et SAKAGUCHI (1955a). Pour ces auteurs, une telle nomenclature était nécessaire car ils se sont intéressés à de nombreuses souches pour lesquelles la sectorisation pouvait revêtir plusieurs aspects. Ici, seules trois classes phénotypiques ont été répertoriées : les souches présentent une sectorisation, les souches uniformément blanches, les souches uniformément sporulées. L'hypothèse de départ était que les souches sectorisées proviennent de la ségrégation d'une association hétérocaryotique formée entre souche à sporulation uniforme et souche blanche.

Les souches blanches n'étant constituées pour la plupart que d'un mycélium pratiquement stérile, les clonages sont délicats. Aussi avons-nous testé leur stabilité par repiquage en tubes à intervalles de 15 jours. Pour les autres souches isolées à l'issue du premier et du deuxième clonage, elles ont subi directement le sous-clonage suivant sans qu'aucune étape de repiquage ne soit intervenue. A la suite du troisième clonage, 10 souches à sporulation uniforme ont été retenues dans chacun des deux cas et testées par repiquage pour leur stabilité. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant (tableau 7).

1^{ere} PARTIE

Tableau 7 : Protocole de clonage et résultats obtenus sur la souche BrBv IV initialement sectorisée. Pour chaque clonage, 100 spores ont été isolées.

	phénotypes souche	souches à sporulation uniforme	souches blanches	souches sectori- sées
1er clonage	BrBv IV initiale	19 (38) (58) (27)	9 (41) (64) (36)	72 (45) (97)
2ème clonage	58	65 (587)	15	20
	38	80 (381)	2	18
	21	68	2	30
	45	40	29	31
	97	69	21	10
	41	32	30	38
3ème clonage	587	63	3	34
	381	65	11	24

() : numéro des souches ayant été retenues pour une nouvelle étape de clonage.



3) DISCUSSION

La stricte obtention de types morphologiquement stables après clonage de 100 spores, a été retenue comme critère de stabilité. Pour les souches uniformément blanches, dont la sporulation ne permet pas le sous-clonage, leur stabilité se conserve pendant deux à trois repiquages. Passé ce stade, on voit apparaître en tubes des plages sporulées qui, lorsqu'on les prélève, redonnent immédiatement des souches à sporulation abondante et à forte sectorisation. Un clonage réalisé après le 4ème repiquage de la souche 41 montre que les 3 types morphologiques sont retrouvés.

De la même façon, pour les souches à sporulation uniforme, une stabilisation du caractère ne se produit pas à la suite du deuxième clonage. On remarque en effet que les souches 38 et 58 engendrent à nouveau des clones sectorisés (18 et 20 %) ainsi que des colonies blanches (2 et 15 %).

Si la sectorisation résulte bien de la ségrégation d'une association hétérocaryotique, il faut considérer alors que des souches morphologiquement stables peuvent être produites à partir de conidies possédant des noyaux génétiquement différents. Ceci suppose d'une part qu'au sein d'une même expérimentation des souches hétérocaryotiques ne ségrègent pas alors que d'autres y sont amenées puisque dans tous les cas des clones sectorisés apparaissent, d'autre part qu'un système complexe de complémentation doit s'établir entre les types nucléaires impliqués puisqu'aussi bien des souches blanches ou des souches à sporulation uniforme peuvent demeurer hétérocaryotiques.

Dans ces conditions, on pouvait s'attendre à ce qu'une souche initialement sectorisée conduite à l'obtention plus importante de clones stables, puisqu'une première ségrégation était intervenue. Cependant, si il semble que ce soit le cas pour la souche 97 où seuls 10 % des clones sectorisent, les résultats obtenus pour la souche 45 ne le confirment pas.

Ces premières données ne nous ayant pas permis de conclure, nous avons répété l'expérience en sélectionnant parmi les souches 38 et 58, 2 colonies à sporulation uniforme, les clones 381 et 587.

Là encore, bien qu'initialement homogènes, ces deux clones ségrègent à nouveau conduisant à des résultats sensiblement équivalents à ceux obtenus lors du second clonage. A l'évidence, la sélection au hasard d'une colonie homogène ne conduit pas à la stabilisation du caractère. Il nous a semblé

préférable alors d'isoler 10 colonies issues du 3ème clonage pour chacune des deux souches testées. Il était en effet peu probable que toutes proviennent de conidies hétérocaryotiques, et dans ces conditions, au moins certaines devraient demeurer stables après plusieurs repiquages.

Parmi les 20 colonies isolées provenant du clonage des souches 587 et 381, toutes ont engendré des secteurs après 2, 3 ou 4 repiquages successifs.

Devant de tels résultats, il était difficile de considérer que la sectorisation soit le reflet d'un stade hétérocaryotique car alors, non seulement une ségrégation devait apparaître mais encore, vu le faible nombre de noyaux que possèdent les conidies de cette souche, elle aurait dû intervenir plus rapidement. En effet, les travaux de THORBEC et EPLOV (1974) sur des hétérocaryons d'*Aspergillus oryzae* ont pu montrer que seuls 5 à 10 % des conidies demeuraient hétérocaryotiques à chaque nouvelle génération asexuelle et ceci pour une souche dont le nombre moyen de noyaux par conidie était de l'ordre de 2,5.

Nous n'avons pas recherché plus avant à stabiliser les caractères morphologiques de cette souche par la technique des clonages car vraisemblablement le déterminisme de la sectorisation est à rechercher ailleurs que dans le maintien d'une hétérocaryose. On sait que d'autres sources de variation sont possibles en dehors de la seule hérédité nucléaire. Les mitochondries sont porteuses d'informations génétiques et donnent naissance à des ségrégations tout à fait particulières. De même, la présence de génomes viraux dans les cellules fongiques semble elle aussi constituer une part de la variabilité observée (LAPIERRE et coll., 1970). Sans doute serait-il intéressant de voir à ce niveau l'origine de la sectorisation dont la seule hérédité nucléaire ne semble pas rendre compte.

C H A P I T R E I :

PHYSIOLOGIE DE LA BIOSYNTHESE D' α -AMYLASE CHEZ LES SOUCHES BRBV IV ET 1135.

INTRODUCTION

L'étude comparative que nous entreprenons a pour objet de mieux comprendre les modalités de la biosynthèse d' α -amylase chez *Aspergillus oryzae*. A cet égard, l'emploi de souches d'origines différentes et caractérisées par un écart de production important, nous a semblé répondre aux besoins d'une telle étude, puisqu'il sera possible d'enregistrer non seulement les réponses physiologiques communes aux deux souches, mais encore les variations propres à chacune d'elles. L'analyse de ces variations individuelles et de leurs rapports avec la biosynthèse d' α -amylase, devrait conduire alors à la mise en évidence des différences physiologiques responsables de l'activité enzymatique de chaque souche.

Comme de nombreux paramètres sont susceptibles d'intervenir dans la biosynthèse de cette enzyme, nous avons entrepris une revue bibliographique afin de faire une synthèse des travaux existants et d'en déterminer un plan de recherche.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

L'axe principal des travaux effectués sur la production d' α -amylase chez *Aspergillus oryzae* a été la recherche des conditions culturales et nutritionnelles les plus favorables à la synthèse. Etant donné la diversité des souches et des systèmes d'études employés par les auteurs, le rôle de certains éléments apparaît souvent contradictoire, parfois favorisant, parfois inhibant la synthèse. Parallèlement à ces travaux, un intérêt particulier a été porté aux mécanismes possibles de régulation et plus spécialement au rôle de la paroi mycélienne dans ces mécanismes, puisqu'elle constitue la dernière barrière au transport de la protéine du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Nous analyserons donc dans un premier temps le rôle des éléments nutritifs sur la biosynthèse d' α -amylase puis dans un second temps les mécanismes de régulation.

1) INFLUENCE DES CONSTITUANTS DU MILIEU DE CULTURE SUR LA BIOSYNTHESE D' α -AMYLASE

a) La source de carbone :

L'amidon est généralement cité comme l'élément carboné le plus favorable à la synthèse d' α -amylase (KUNDU et coll., 1972 ; ANDRZEJCZUK-HYBEL et coll., 1971a), cependant les auteurs notent qu'un temps de latence assez important affecte à la fois la croissance et la production d'enzyme, dû au fait que l'amidon ne peut être utilisé par le microorganisme qu'après un début d'hydrolyse. Pour VALLIER et coll. (1977) l'amidon jouerait surtout un rôle d'agent stabilisateur de la conformation tertiaire de la protéine limitant ainsi sa dénaturation, mais ne serait pas plus favorable à la synthèse que d'autres sources de carbone comme le saccharose.

Les dextrines en tant que produits d'hydrolyse de l'amidon semblent aussi très efficaces. Au laboratoire, DEPREZ (1977) a étudié leur action sur la souche BrBv IV et a montré qu'elles permettent une synthèse plus importante que celle obtenue sur amidon grâce à une réduction de la phase de latence.

Les sucres simples et les oligosaccharides ont eux aussi fait l'objet d'études diverses. TONOMURA et coll. (1961) après avoir étudié une

trentaine de sucres, montrent que le glucose, le saccharose et le lactose sont des inhibiteurs de la synthèse et que les oligosaccharides, pour être efficaces, doivent être nécessairement des α -glucosyl-glucose. Ils notent ainsi que le maltose ($\text{glc}^{\alpha 1,4}\text{-glc}$) et l'isomaltose ($\text{glc}^{\alpha 1,6}\text{-glc}$) sont de loin les meilleurs substrats. Par contre pour KUNDU et coll. (1972) le glucose permet une formation d' α -amylase supérieure à celles obtenues sur maltose ou sur dextrine.

D'autres sources de carbone ont été utilisées, mais généralement avec peu de succès. C'est le cas en particulier de l'acétate de sodium, du pyruvate de sodium ou du citrate de sodium. Ces éléments ne favorisent guère ni la croissance ni la synthèse le plus souvent à cause d'une acidification importante des milieux de culture. ANDRZEJCKZUK-HYBEL et coll. (1971a) notent cependant l'effet positif d'une incorporation d'acide citrique dans un milieu à base d'amidon. Pour ces auteurs, il semblerait que l'acide citrique provoque une augmentation de certains métabolites du cycle tricarboxylique et en particulier du glutamate et de l'aspartate dont l'action bénéfique sur la synthèse a été décrite (DEPREZ, 1977 ; KUNDU et coll., 1972).

b) La source d'azote :

Les besoins en azote peuvent être assurés soit par les formes organiques soit par les formes minérales de cet élément. L'étude de l'influence de ces différentes formes sur la production d' α -amylase montre qu'en général, l'azote organique convient mieux à la synthèse de cette enzyme (SMIRNOVA, 1955). Il est à noter cependant que les concentrations en azote utilisées par la plupart des auteurs sont toujours assez faibles et conduisent à des rapports carbone/azote élevés. Dans ces conditions, il semble que les formes minérales soient aussi efficaces voire même supérieures aux formes organiques. Pour KUNDU et coll. (1972) par exemple, le nitrate d'ammonium, ou le nitrate de sodium, incorporé dans un milieu à raison de 0,05 % d'azote (le carbone étant fourni à raison de 20 g/l d'amidon) conduit à des productions d' α -amylase supérieures aux peptones, tryptones, acides glutamique et aspartique employés à même concentration d'azote.

MEYRATH (1975) montre au contraire qu'il est nécessaire d'augmenter la concentration en azote dans les milieux si l'on veut obtenir une bonne production, mais alors se pose le problème de l'ion d'accompagnement dans les formes minérales. En effet, l'utilisation de certains sels en particulier du sulfate d'ammonium est déconseillée, l'accumulation d'ions $\text{SO}_4^{=}$ acidifiant par trop les milieux (SMIRNOVA, 1955). Dans ces conditions, l'emploi d'azote organique est préférable car l'évolution du pH au cours de la culture

se maintient dans une zone propice à la croissance et à la production d' α -amylase. Pour DEPREZ (1977) le glutamate de sodium associé à l'urée constitue la meilleure source d'azote, le pH des cultures passant de 6,5 à l'origine à 8,5 au 4ème jour.

c) Les éléments minéraux :

Une part restreinte a été accordée aux éléments minéraux dans la production d' α -amylase. Pour KUNDU et coll. (1972) les ions K^+ , Na^+ , Cl^- , $SO_4^{=}$ sont sans effet sur la biosynthèse, par contre Mg^{++} et Ca^{++} semblent jouer un rôle plus important. Les résultats présentés par ces auteurs montrent que le magnésium augmente considérablement la croissance par rapport à un milieu dépourvu de cet élément et corrélativement permet une synthèse accrue d' α -amylase. A l'inverse, le calcium n'induit qu'un faible accroissement de la biomasse par rapport au milieu témoin mais diminue de façon sensible la production d'enzymes. Pour ces auteurs, l'effet antagoniste de Mg^{++} et Ca^{++} est à rechercher dans leur rôle respectif sur les hexokinases qui seraient inhibées par Ca^{++} et nécessiteraient Mg^{++} pour leur fonctionnement.

Le rôle du phosphore est par contre très controversé. Pour KOZYRIOVA (1971) un milieu ne contenant qu'une faible concentration en phosphore favorise le passage de l'enzyme de la cellule au milieu de culture alors que des concentrations importantes conduisent à une rétention de la protéine à l'intérieur du mycélium. Des résultats totalement contraires ont été présentés par YABUKI et FUKUI (1970) ainsi que par TONOMURA et coll. (1963). Pour ces derniers, la libération de la protéine dans le filtrat serait assurée par l'intermédiaire de phosphopeptides liés à α -amylase par des liaisons phosphoriques. Dans ces conditions, une augmentation de l'activité des phosphatases est très défavorable à la libération de l'enzyme et il semble que ce soit le cas dans un milieu déficient en phosphates.

Un intérêt particulier a également été porté à certains sels tels que NaF , NaN_3 ou KCN qui, à faibles concentrations, inhibent partiellement la respiration. Cette inhibition mesurée dans un appareil de WARBURG s'accompagne d'une plus faible utilisation des hydrates de carbones mais ne semble pas affecter la croissance (MALKOV et DEEVA, 1961). Dans ces conditions une augmentation très nette de l'activité α -amylase a pu être observée.

2) LES MECANISMES REGULATEURS DE LA BIOSYNTHESE

A l'heure actuelle, plusieurs mécanismes ont été proposés sans pour autant recueillir l'adhésion de l'ensemble des chercheurs. Il semble cependant que la paroi mycélienne joue un rôle prépondérant dans cette régulation, puisqu'elle assure en dernier lieu le transport de la protéine du milieu intracellulaire au milieu extracellulaire.

Pour l'école soviétique, c'est l' α -amylase elle-même qui assure sa propre régulation. YURKEVITCH et KOZYRIOVA (1967) montrent qu'en ajoutant au milieu de culture une préparation purifiée d' α -amylase à une concentration supérieure à celle que la souche peut produire en culture, aucune synthèse n'est enregistrée. Ces auteurs insistent sur le fait qu'il existe une concentration limite, ou seuil, en dessous duquel l'inhibition ne se fait plus sentir. D'autre part, seule l' α -amylase active joue un rôle régulateur, car la même protéine dénaturée à la température, ou l'adjonction d'albumine, n'ont aucun effet sur la biosynthèse. Un second argument est apporté par KOZYRIOVA (1971) qui a déterminé la valeur du seuil sur un milieu contenant du phosphore ou sur un milieu déficitaire en cet élément. Dans cette dernière condition, toute l' α -amylase est excrétée dans le milieu de culture alors qu'en présence de phosphore une quantité plus importante demeure à l'intérieur des cellules. Il semble alors que sur le milieu contenant du phosphore, le seuil en dessous duquel l' α -amylase n'agit plus sur sa propre biosynthèse, soit supérieur à celui qui est nécessaire sur un milieu privé de cet élément. Pour l'auteur, cela traduit la nécessité d'un rapport entre les concentrations intracellulaires et extracellulaires d' α -amylase pour que la régulation s'effectue.

S'intéressant au rôle possible de la paroi dans ce phénomène, YURKEVITCH et KOZYRIOVA (1972) isolent des protoplastes d'*A. oryzae* et montrent qu'ils perdent toute sensibilité à la concentration en α -amylase du milieu. L'élimination de la paroi entraînerait donc la synthèse d' α -amylase à un niveau élevé due à une absence de régulation.

Pour l'école japonaise, la paroi présente aussi un effet régulateur, mais son mode d'action semble différent.

YABUKI et FUKUI (1970) travaillent sur des parois purifiées d'*A. oryzae* et montrent qu'elles sont capables de fixer l' α -amylase en grandes quantités, dès lors qu'elles ont subi un traitement à la soude normale à 100°C pendant 30 minutes. Ces auteurs suggèrent qu'il existe au niveau de la paroi des sites

de fixation pour l' α -amylase mais qu'ils peuvent être saturés préférentiellement par une molécule appelée "Masking factor". Le traitement alcalin aurait alors pour effet d'éliminer cette molécule et de rendre à la paroi ses capacités de rétention initiales. Une purification des parois a permis d'isoler la molécule en question dont la nature protéique a été montrée. Partant de ces observations, les auteurs ont proposé le modèle de régulation suivant. L' α -amylase avant d'être excrétée dans le milieu subirait une étape de fixation sur la paroi, puis la synthèse du "Masking factor" déplacerait cet équilibre en occupant préférentiellement les sites, libérant ainsi l'enzyme dans le milieu.

Ces auteurs ont d'autre part mis en évidence que la capacité des parois à fixer l' α -amylase était fonction du milieu de culture dans lequel le Champignon avait été cultivé. En l'absence de traitement alcalin, les parois provenant d'un milieu non inducteur de la synthèse d' α -amylase fixent de grandes quantités de cette dernière. A l'opposé, sur un milieu contenant de l'amidon, la capacité de fixation est faible comme le montre le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Relation entre la sécrétion d' α -amylase et la capacité de fixation des parois non traitées (d'après YABUKI et coll., 1970).

<i>Milieux</i>	<i>Sécrétion d' α-amylase dans le milieu ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>Aptitude des parois à fixer l' α-amylase ($\mu\text{g}/10 \text{ mg de paroi}$)</i>
<i>Amidon-peptones-sol-minérale</i>	12,3	2
<i>Peptones-sol-minérale</i>	0,7	68

Pour les auteurs, la protéine masquante serait donc inductible et c'est l'amidon qui jouerait le rôle d'inducteur.

Pour YABUKI et coll. (1977) la paroi joue également un rôle dans l'induction proprement dite de la synthèse d' α -amylase. Ici, l'étude n'a pas été réalisée en culture comme c'est le cas pour la plupart des travaux déjà cités mais sur des portions d'un mycélium préalablement cultivé sur un milieu

non inducteur de la synthèse et soumis à un jeûne de plusieurs heures dans une solution saline afin d'augmenter sa sensibilité vis-à-vis de divers inducteurs.

Lorsqu'à ce mycélium on ajoute une solution de maltose considéré comme le meilleur inducteur et que l'on mesure après 1 heure d'incubation la quantité d'enzymes à l'intérieur des cellules et dans le milieu, on constate qu'elles sont sensiblement équivalentes. Par contre, au bout de 2 heures, l'activité du milieu de culture est très nettement supérieur à celle du mycélium dont la valeur n'a pratiquement pas changée.

Il y aurait donc un mécanisme d'induction à deux étapes, la première ne permettant qu'une synthèse modérée alors que la seconde conduirait au rythme normal. L'explication du phénomène fournie par les auteurs serait la suivante. Le maltose dans un premier temps pénétrerait dans la cellule à un niveau faible par l'intermédiaire d'une perméase constitutive, puis sa concentration augmentant, une perméase inductible serait produite conduisant à l'entrée massive de l'inducteur.

3) DISCUSSION

A la lecture de ces travaux, plusieurs points ont retenu notre attention. Tout d'abord, la synthèse d' α -amylase semble très dépendante des conditions nutritives et en particulier de la nature de la source carbonée. Cependant peu d'informations concernent l'influence de ces différents substrats sur la croissance et l'évolution du pH en cours de culture, de sorte qu'il est difficile de savoir si une synthèse plus importante est liée à une croissance supérieure à celle des témoins ou encore à une fluctuation différente du pH. On note également que pour bon nombre de ces substrats carbonés, leur rôle n'est pas clairement défini puisque par exemple le glucose, le maltose ou les dextrines apparaissent tantôt favoriser, tantôt réduire la production de cette enzyme. Il en va de même pour le phosphore qui, selon le cas, inhibe ou induit l'excrétion de la protéine dans le filtrat de culture.

A l'évidence, peu d'éléments font l'objet d'un accord quant à leur rôle effectif dans la synthèse d' α -amylase. Dans ces conditions, on peut penser qu'au moins en partie l'origine des souches utilisées peut être responsable

des variations que l'on observe. Il semble donc qu'un des premiers aspects que nous ayant à traiter soit de montrer si en fonction des constituants du milieu de culture, des réponses particulières à chacune des souches sont enregistrées ou bien si l'on observe des résultats homogènes.

Le second point sur lequel nous nous sommes arrêté est l'intérêt que semble avoir porté plusieurs auteurs à la paroi en tant que système de régulation. Bien que les mécanismes invoqués ne soient pas unitaires, tous lui confèrent un rôle actif dans le phénomène. Ici encore, une voie de recherche nous est ouverte puisqu'on peut penser qu'en raison d'évolution différente, les souches BrBv IV et 1135 possèdent, au niveau de la paroi, des modalités particulières de régulation.

Nous avons donc à notre disposition deux voies d'études qui devraient nous permettre de savoir si la différence d'activité des souches est sous la dépendance de la paroi en supposant que la régulation ne s'effectue pas de manière identique dans les deux souches, ou sous la dépendance d'un métabolisme particulier qu'il sera nécessaire de préciser. C'est par ce dernier point que débutera notre étude.

II. ETUDE PHYSIOLOGIQUE EN CULTURES AGITÉES

Les raisons pour lesquelles nous avons choisi la culture agitée comme système d'étude, ont été brièvement exposées au chapitre I "matériel et méthode" comme étant un mode de culture plus proche de celui employé en fermentation industrielle que ne l'est la culture stationnaire. En effet, dans les deux cas, le mycélium est immergé et n'a d'échanges gazeux qu'avec le milieu liquide environnant. Les différences entre ces deux systèmes sont cependant profondes puisqu'en cultures agitées il n'est pas possible de maîtriser des paramètres tels que le pH ou l'aération du milieu alors qu'en fermenteurs des régulations existent. Toutefois, dès lors que ces paramètres ne jouent pas, par leurs valeurs, le rôle de facteurs limitants sur la croissance, la biosynthèse ou la stabilité de l'enzyme, les cultures agitées permettent une bonne évaluation des aptitudes d'une souche à produire une enzyme donnée en conditions industrielles.

1) COMPORTEMENT DES SOUCHES SUR LE MILIEU DE REFERENCE

Il est étaiit utile de disposer d'un milieu de culture synthétique sur lequel la synthèse d' α -amylase soit optimisée afin de mesurer avec précision le taux de production de chaque souche. Une étude réalisée au laboratoire par DEPRES (1977) sur la recherche des conditions optimales de production d' α -amylase de la souche BrBv IV a permis la mise au point d'un milieu dont la conception répondait aux exigences discutées dans la partie bibliographique, à savoir :

- contenir une forte proportion d'azote organique ;
- posséder une source de carbone favorable à la synthèse ;
- maintenir le pH dans une zone propice à la croissance et à la production d' α -amylase.

Sa composition est la suivante :

- maltodextrines MDO ₃ (Roquette).....	30 g
- glutamate de sodium monohydraté.....	34 g
- urée.....	6 g
- KH ₂ PO ₄	1,6g
- Ca(PO ₄ H ₂) ₂ ,H ₂ O.....	0,8g
- MgSO ₄ ,7H ₂ O.....	0,5g
- MnSO ₄ ,H ₂ O.....	0,02g
- ZnSO ₄ ,7H ₂ O.....	0,02g
- CuSO ₄ ,5H ₂ O.....	0,01g
- eau distillée.....	1000 ml

pH après stérilisation = 6,8.

Les maltodextrines MDO₃ fabriquées par la Société Roquette sont obtenues par hydrolyse ménagée de l'amidon. Leur composition hydrocarbonée est celle-ci :

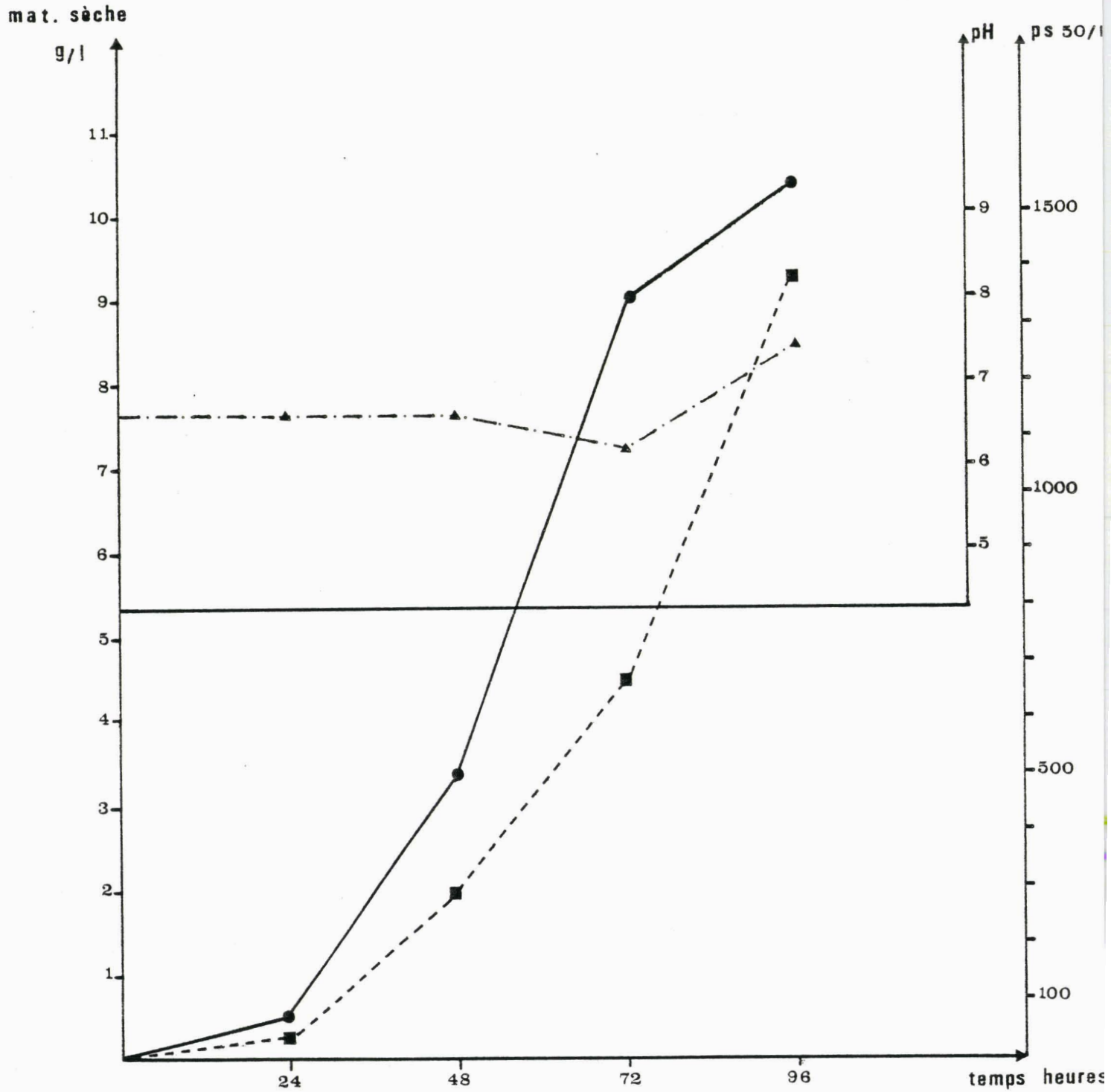
- polysaccharides.....	94 %
- maltose.....	5 %
- glucose.....	1 %.

Puisque ce milieu semblait très favorable à la synthèse d' α -amylase, pour la souche BrBv IV nous l'avons donc retenu comme base de nos expérimentations.

a) Résultats :

Plusieurs séries culturales réalisées au cours de deux années nous ont permis de tracer les courbes figurées sur les planches 4 et 5.

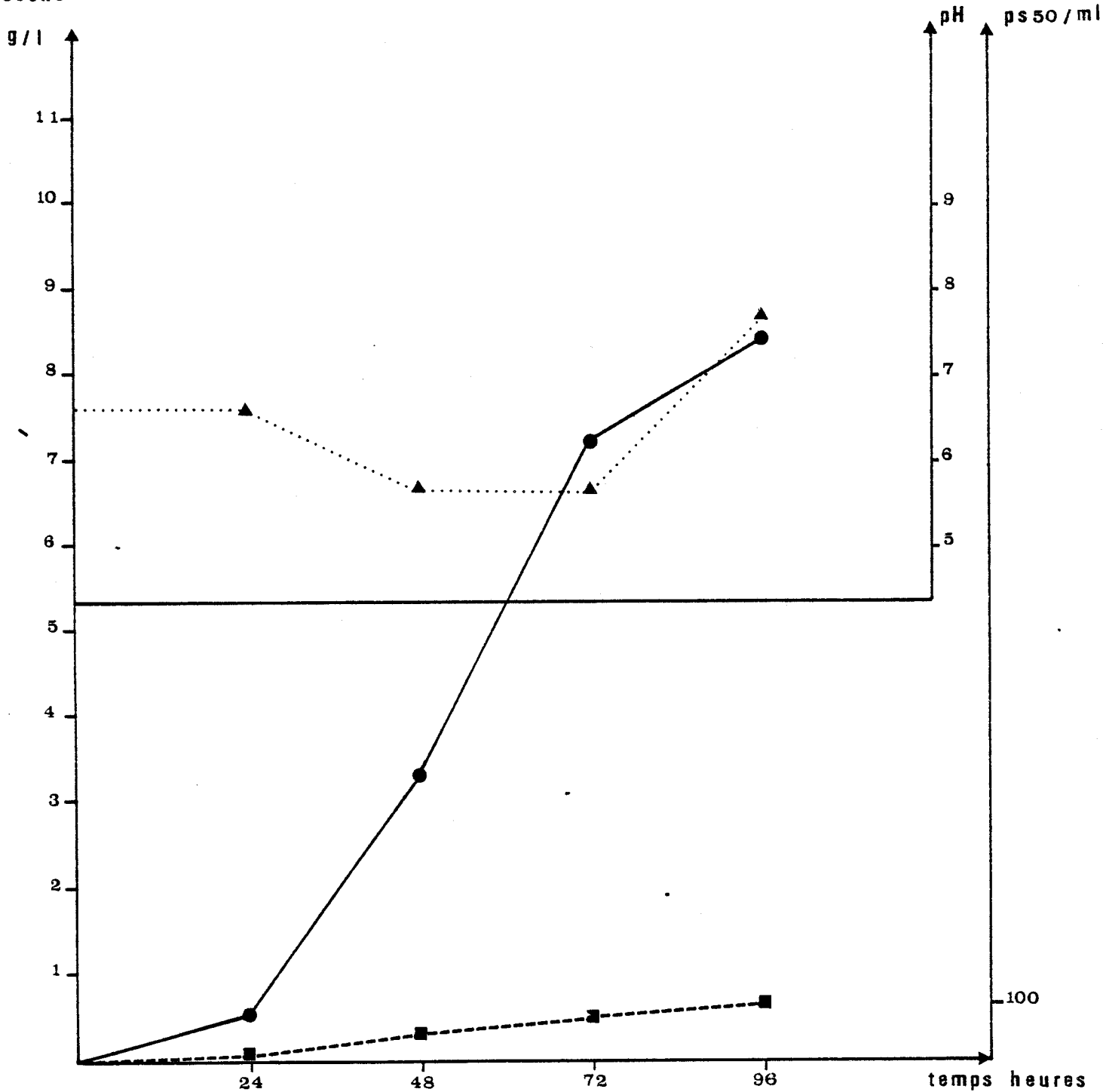
Planche 4 : Croissance, évolution du pH et synthèse d' α -amylase de la souche BrBv IV cultivée sur le milieu de référence.



mat. sèche ●—●
 pH ▲-.-▲
 ps 50 ■- - -■

Planche 5 : Croissance, évolution du pH et synthèse d' α -amylase de la souche 1135 cultivée sur le milieu de référence.

t. sèche



mat. sèche ●—●

pH ▲...▲

ps 50 ■- - -■



Elles représentent les valeurs moyennes que nous avons obtenues pour les trois paramètres suivis.

b) Discussion :

Le comportement de ces deux souches sur ce milieu de référence appelle plusieurs remarques.

Tout d'abord, leurs activités amylolytiques sont très différentes, la souche BrBv IV donnant à 96 heures un titre d'environ 1400 PS 50/ml alors que dans les mêmes conditions, la souche 1135 n'en produit que 100 PS 50/ml. Ceci confirme donc les informations que nous possédions quant à leurs activités respectives.

Concernant la croissance, on remarque également des différences importantes. Si jusqu'à 48 heures elle est identique pour les deux souches, on observe cependant que dès cet instant l'inflexion de la courbe pour la souche 1135 s'amorce, ceci n'ayant lieu que plus tardivement pour la souche BrBv. En conséquence, un ralentissement très sensible de la croissance apparaît pour cette souche qui se traduira à 96 heures par un poids de matière sèche inférieur d'environ 20 % à celui de la souche BrBv IV.

On remarque cependant qu'à 96 heures aucun plateau n'apparaît dans ces courbes. En fait ce stade est très fugace. Des essais préliminaires nous ont permis de constater qu'à 120 heures on enregistrerait dans les deux cas une chute importante de la croissance consécutive à une lyse du mycélium. Comme l'ont montré VALLIER et coll. (1977), cette lyse débute dès que le pH est supérieur à 7,2 et est maximum à pH 8,8. Son influence sur le taux final d' α -amylase est très controversée. Pour ces auteurs, elle est directement responsable de la libération de l'enzyme dans le milieu, par contre on a pu voir que les travaux soviétiques et japonais faisaient intervenir des mécanismes actifs pour cette libération. L'expérience nous a montré que pour la souche 1135 une perte d'activité se produisait dans ces conditions alors que pour la souche BrBv IV une augmentation de 5 à 10 % était enregistrée. Pour cette raison, il nous a semblé préférable de nous placer dans des conditions où la lyse intervienne le moins possible, et donc d'arrêter les cultures avant qu'elle ne se produise en totalité.

La troisième constatation que nous pouvons faire, concerne l'évolution du pH en cours de culture. On remarque que pour la souche BrBv IV, une variation très faible se produit pendant les trois premiers jours, le pH

passant de 6,7 à 6,4. Par contre, pour la seconde souche l'amplitude de la variation est plus importante, puisqu'une valeur de 5,6 est enregistrée à 48 heures. Dans les deux cas on assiste à une brusque remontée qui atteint pH 7,5 à 8 à 96 heures.

L'observation des différentes séries culturales que nous avons réalisées apporte cependant un élément nouveau à la simple constatation des faits. Nous avons pu remarquer pour les deux souches que des variations assez importantes de la croissance se produisaient au bout de 48 heures d'incubation, dues au fait que la germination des spores servant d'inoculum avait, dans certains cas, été retardée. La raison principale de ce phénomène est sans doute que pour certaines expérimentations les tubes devant servir à l'ensemencement ont été conservés quelques jours à +4°C avant d'être utilisés. Lorsque l'on reporte sur deux graphiques (planches 6 et 7) la valeur du pH et celle de la croissance pour chaque fiole de culture prélevée à 48 heures, on remarque alors qu'une relation très stricte lie ces deux paramètres pour la souche 1135 puisqu'un coefficient de corrélation égal à -0,96 a été calculé. A l'inverse, bien que l'on note une dispersion de la croissance de même amplitude, pour la souche BrBv IV aucune relation de proportionnalité ne peut être mise en évidence. Les profils de pH différents que nous avons constatés entre les souches, trouvent ici leur justification puisqu'il est manifeste pour la souche 1135 que plus la croissance est importante, plus le pH est faible.

La présence d'une relation de proportionnalité entre croissance et pH pour une souche et son absence pour l'autre, traduit sans aucun doute l'existence de différences métaboliques notables qu'il conviendra d'étudier plus en détail afin de voir si on peut leur attribuer une part dans leur différence d'activité α -amylase.

Ces premiers résultats nous ont permis de mettre en évidence un comportement tout à fait particulier de chacune des souches vis-à-vis du milieu de culture que nous avons pris comme référence. Cependant, il était intéressant de montrer si sur un autre milieu un comportement semblable était enregistré ou bien si l'on avait assisté à un phénomène particulier dû au milieu de culture employé. Nous avons alors entrepris de tester un milieu radicalement opposé au précédent, comportant une source de carbone défavorable à la synthèse d' α -amylase afin de voir si en absence de stimulation particulière, la même différence d'activité était observée entre souche. Pour cela nous avons choisi un milieu de Czapek additionné d'extrait de levure dont la composition est la suivante :

Planche 6 : Relation entre croissance et pH après 48 heures de culture sur le milieu de référence pour la souche 1135.

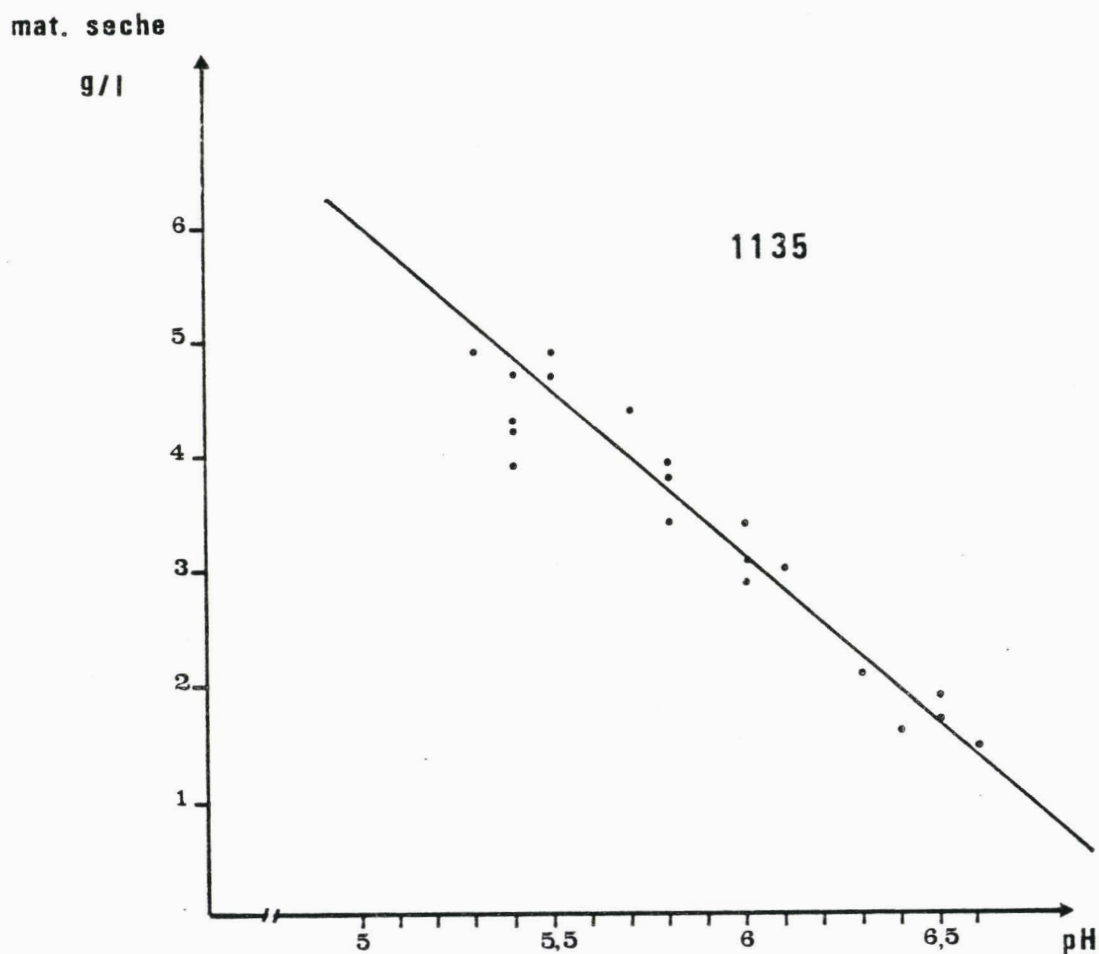
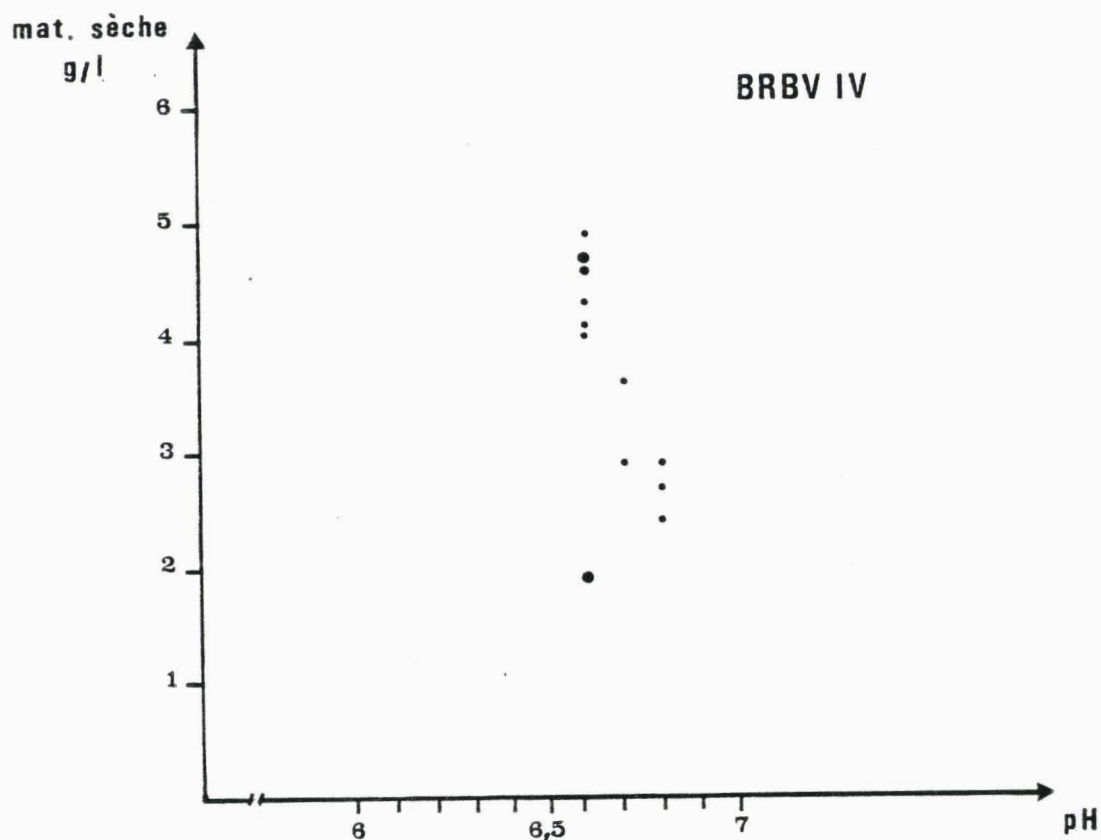


Planche 7 : Relation entre croissance et pH après 48 heures de culture sur le milieu de référence pour la souche BrBv IV.



- saccharose..... 30 g
 - extrait de levure..... 5 g
 - NaNO_3 3 g
 - KH_2PO_4 1 g
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g
 - KCl 0,5g
 - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g
 - eau distillée..... 1000 ml
- pH après stérilisation = 6,0.

2) COMPORTEMENT DES SOUCHES SUR CZAPEK ADDITIONNE D'EXTRAIT DE LEVURE

Les résultats correspondant à cette série sont représentés sur les planches 8 et 9.

Résultats et discussion :

A l'évidence, toutes les observations que nous avons formulées sur le milieu de référence peuvent se vérifier sur Czapek + extrait de levure.

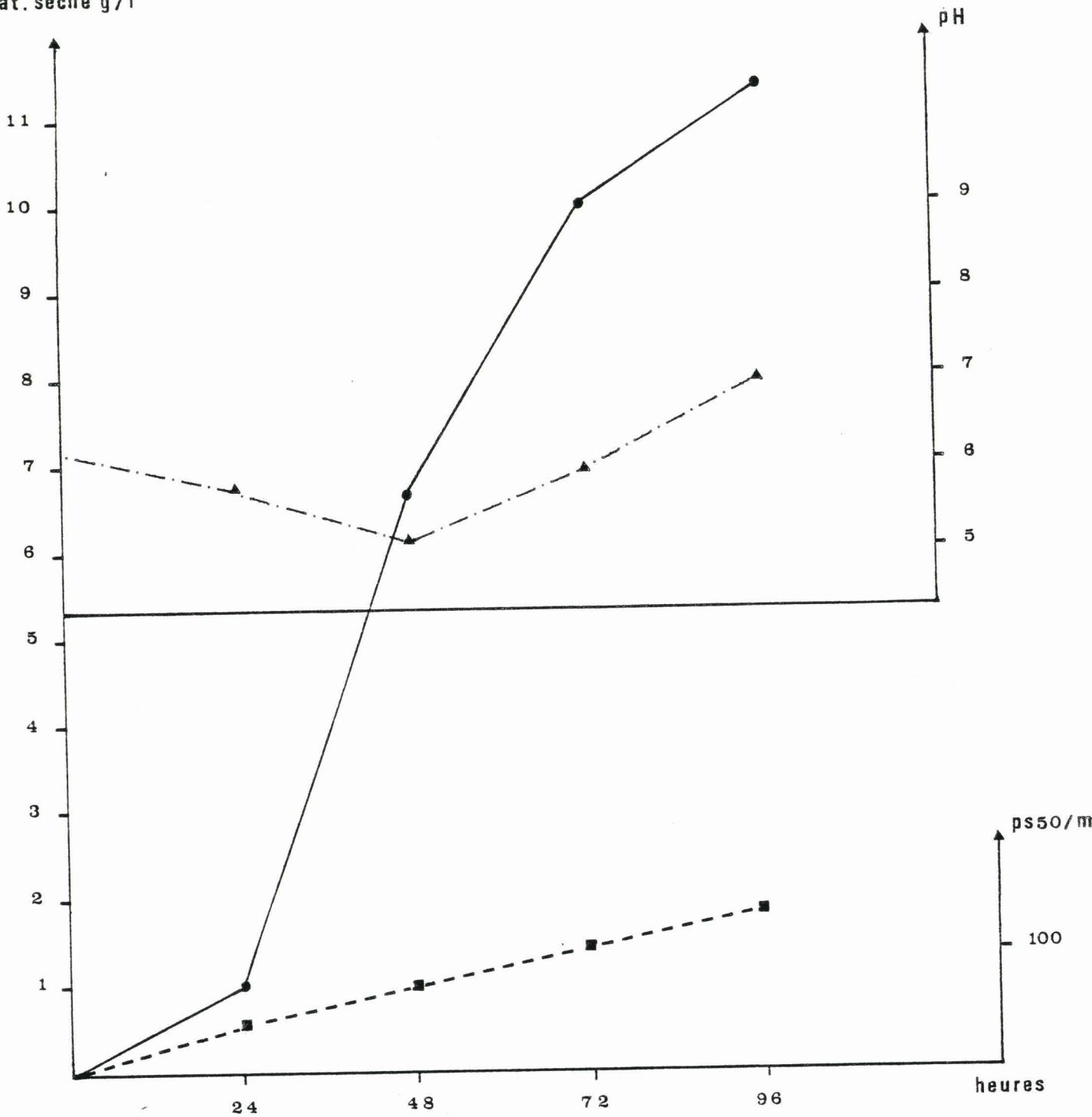
Tout d'abord la croissance des souches montre la même variation puisque la souche 1135 conduit à des poids de matière sèche nettement inférieurs à ceux de la souche BrBv IV. On note d'ailleurs que l'écart de croissance est plus important sur ce milieu qu'il ne l'est sur le milieu de référence sans doute à cause d'une baisse importante du pH à 48 heures pour la souche 1135 qui atteint pH 4, valeur très défavorable à la croissance.

Puisque nous venons d'en faire état, l'évolution du pH est là aussi très significative, étant donné qu'aux plus basses valeurs un écart d'une unité pH est enregistré entre les souches et que c'est encore la souche 1135 qui impose l'acidification la plus forte.

Enfin, si l'on s'intéresse à la production d' α -amylase, on note qu'en dépit d'une diminution très importante due à la présence de saccharose, la synthèse est toujours plus active pour la souche BrBv IV que pour la souche 1135. De plus, on peut signaler que le rapport de production est assez proche de celui obtenu sur le milieu de référence puisqu'on obtient :

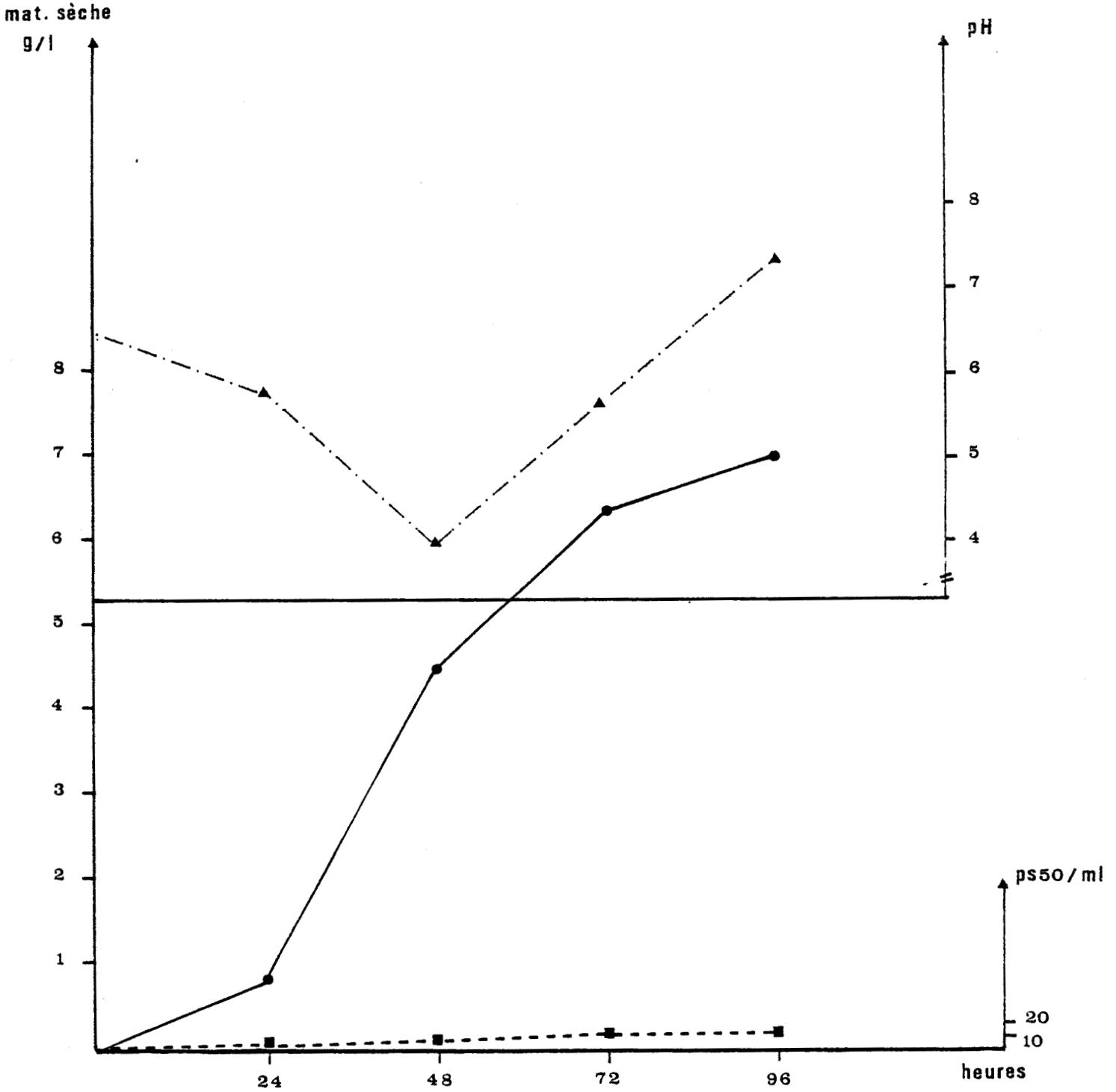
Planche 8 : Croissance, évolution du pH et synthèse d' α -amylase de la souche BrBv IV cultivée sur Czapek additionnée d'extrait de levure à 5 g/l.

mat. sèche g/l



- croissance
- ▲—▲ pH
- -■ a_amylase

Planche 9 : Croissance, évolution du pH et synthèse d' α -amylase de la souche 1135 cultivée sur Czapek additionnée d'extrait de levure à 5 g/l.



▲ — ▲ pH
 ● — ● croissance
 ■ - - ■ a_ amylase



$$- \frac{100}{1400} = 0,07 \text{ sur MDO}_3 \text{ glutamate de Na}$$

$$- \frac{13}{130} = 0,1 \text{ sur Czapek + extrait de levure.}$$

La comparaison de ces deux milieux était nécessaire, puisque désormais on peut être assuré d'un certain nombre de facteurs constants que sont l'activité α -amylase faible de la souche 1135, sa croissance toujours inférieure à celle de l'autre souche et l'acidification qu'elle impose à tous les milieux de culture.

Ces premiers résultats permettent de penser que l'aptitude des souches à produire cette enzyme n'est pas identique et qu'un certain nombre de différences métaboliques en sont la cause. Les données bibliographiques nous ont montré l'importance de la source carbonée dans l'induction de cette biosynthèse et nous avons pu remarquer que leur rôle n'était pas très clairement établi. Aussi, avons-nous envisagé de montrer l'efficacité de certains substrats sur la synthèse d' α -amylase des souches BrBv IV et 1135 et en particulier du glucose et du maltose pour lesquels les avis divergeaient.

3) INFLUENCE DU GLUCOSE ET DU MALTOSE SUR LA BIOSYNTHESE D' α -AMYLASE

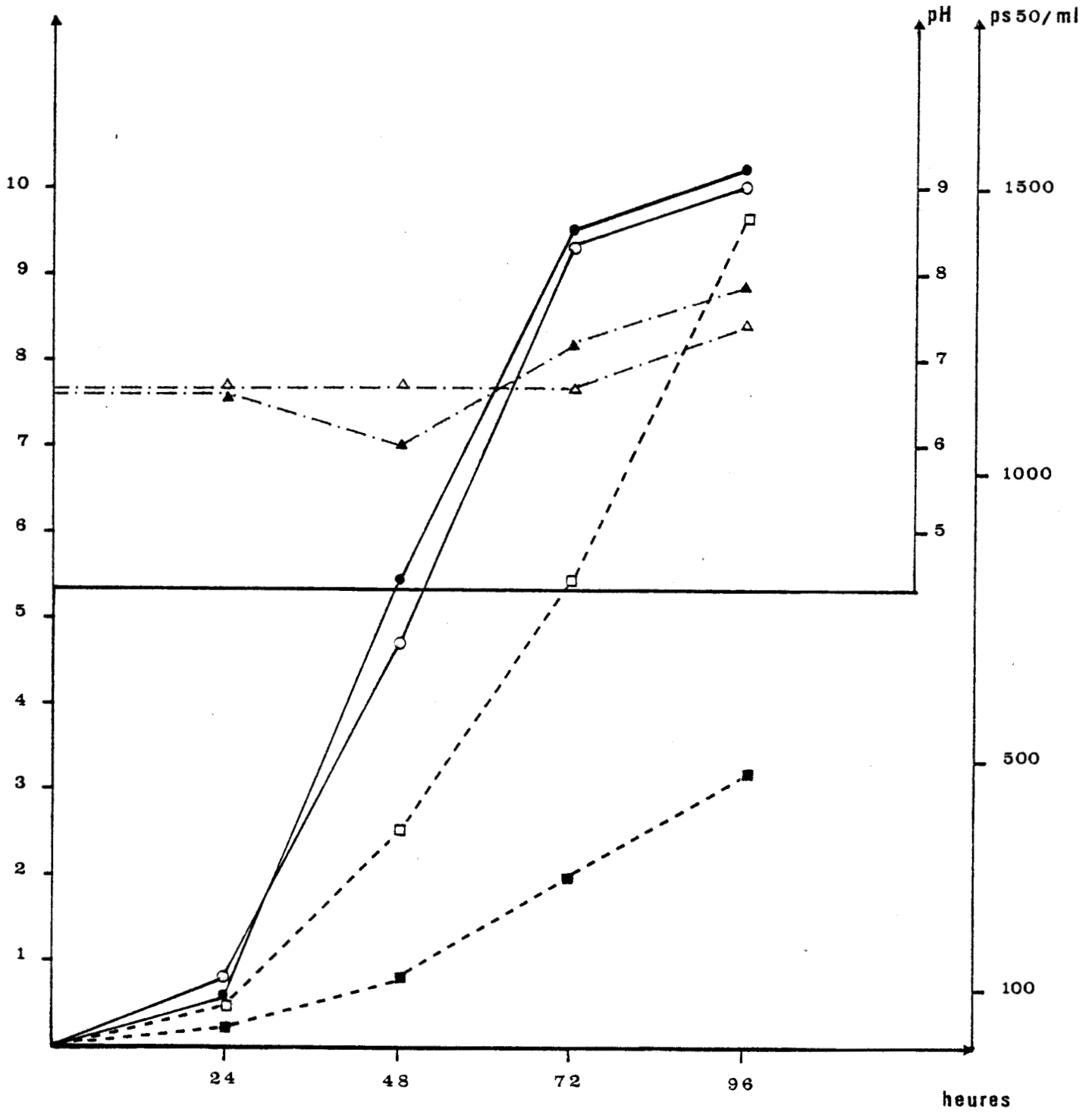
Le milieu de référence favorisant la production d' α -amylase pour les deux souches, c'est sur lui que nous avons modifié la source de carbone. Le glucose ou le maltose sont introduits dans ce milieu en remplacement des maltodextrines et à même concentration, soit 30 g/l. Afin de limiter la variation pour l'interprétation des résultats, une courbe témoin sur maltodextrines est réalisée systématiquement et figure sur les planches 10,11,12 et 13, en même temps que la courbe expérimentale.

a) Influence du glucose :

Une très nette diminution de la production d' α -amylase est enregistrée lorsqu'on remplace les maltodextrines par du glucose. Pour la souche BrBv IV seul le tiers de la synthèse sur milieu témoin est obtenu alors que pour la souche 1135 on assiste à une réduction de moitié.

Planche 10 : Croissance, évolution du pH et synthèse d' α -amylase de la souche BrBv IV cultivée sur glucose ou dextrines.

mat. sèche g/l

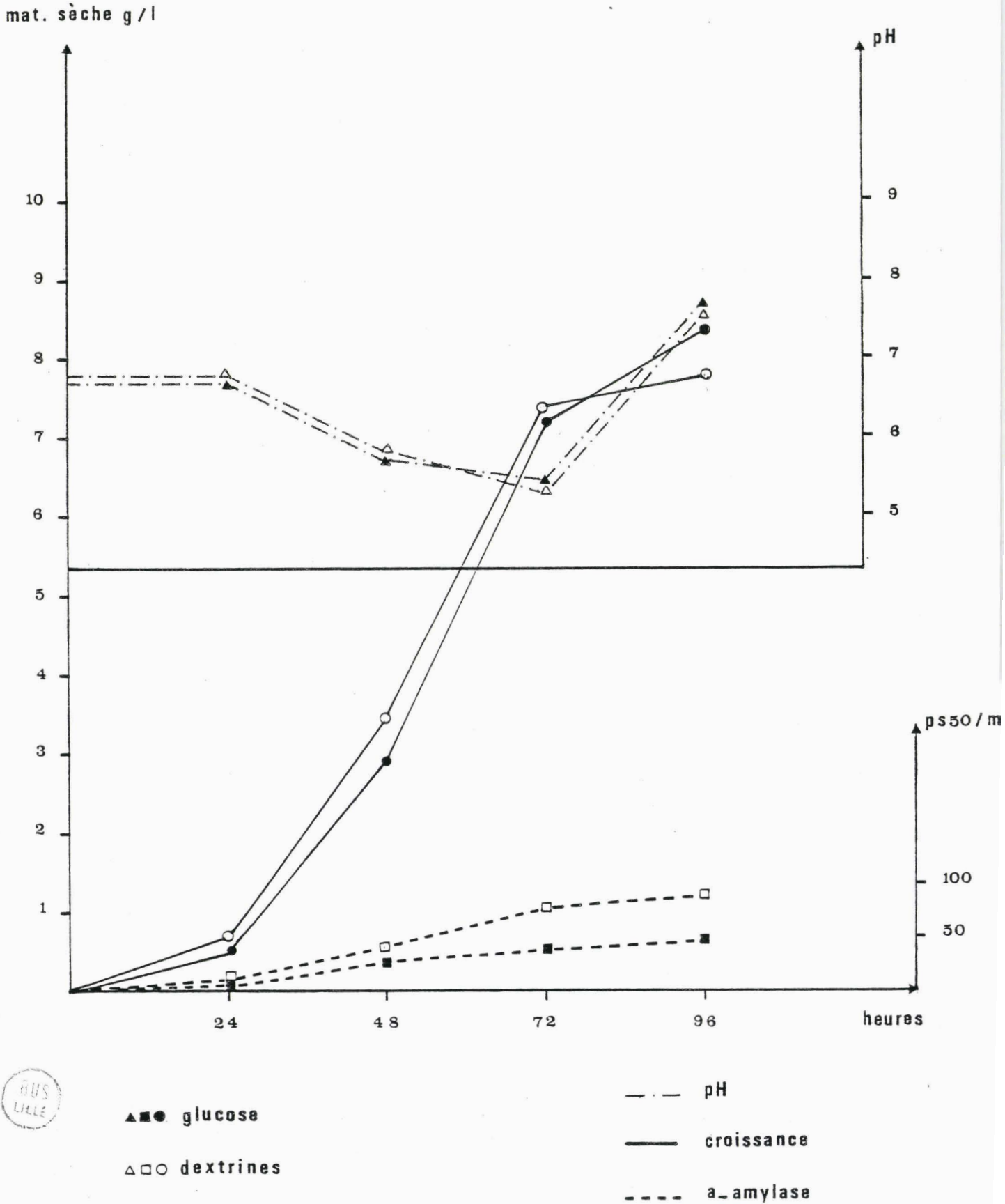


▲■● glucose
 △□○ dextrines

— · — pH
 — croissance
 - - - α -amylase



Planche 11 : Croissance, évolution du pH et synthèse d' α -amylase de la souche 1135 cultivée sur glucose ou dextrines.



Concernant la croissance, on note d'autre part qu'elle ne semble pas affectée par l'emploi du glucose puisque le tracé des courbes est très similaire à celui des maltodextrines.

L'évolution du pH en cours de culture montre cependant une différence de comportement entre souches puisqu'une chute de pH se produit à 48 heures pour la souche BrBv IV cultivée sur glucose alors que pour la souche 1135 l'évolution du pH sur ce milieu est tout à fait comparable à celle obtenue sur maltodextrines. Cependant, il n'est pas impossible que l'acidification naturelle de cette souche masque une chute de pH effective mais d'amplitude comparativement plus faible.

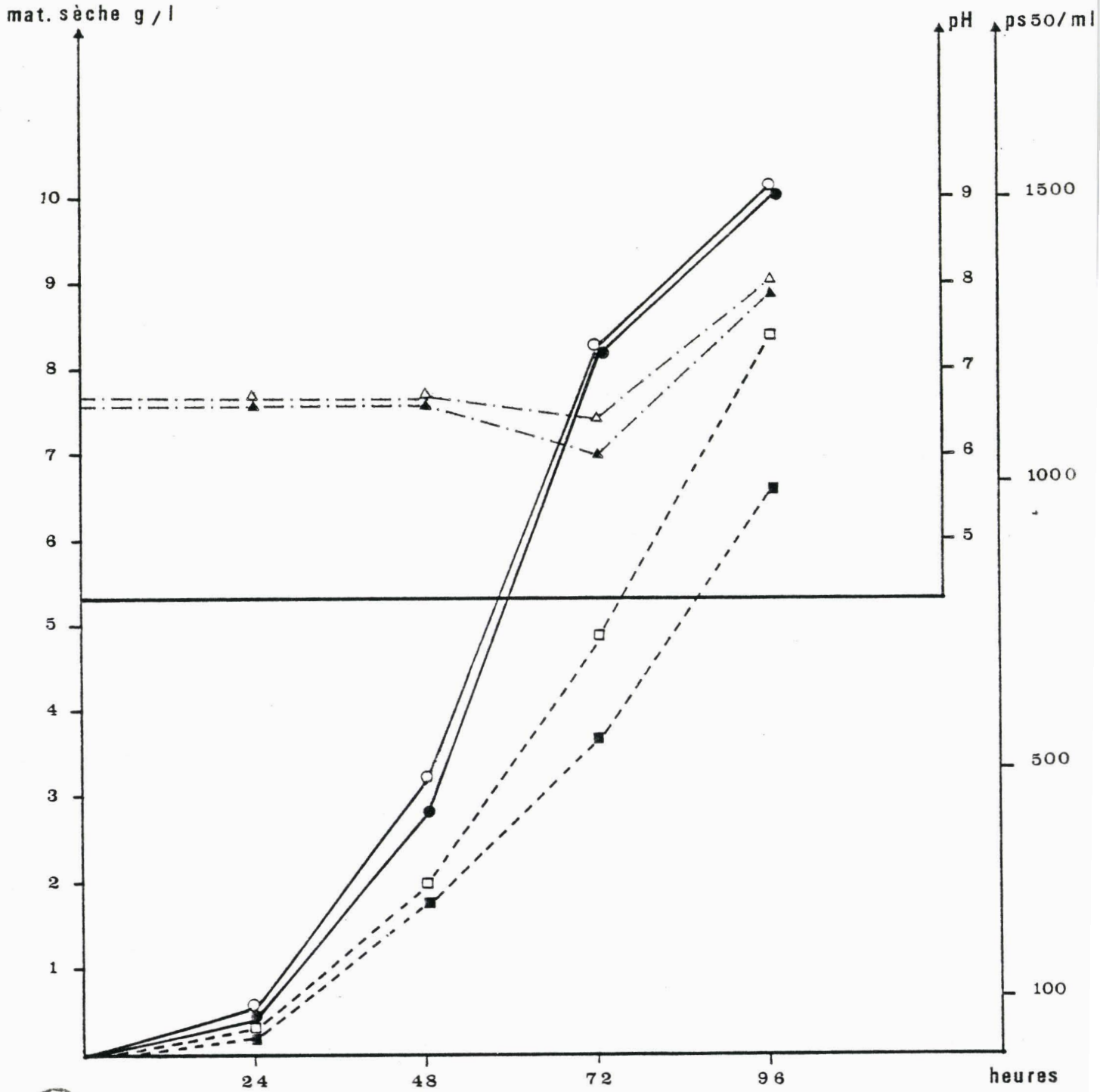
Ces résultats montrent toutefois une homogénéité certaine des réponses physiologiques de nos souches à l'application d'un même stimulus. Le glucose qui a pu être décrit tantôt inducteur, tantôt inhibiteur de cette synthèse présente dans notre expérimentation un effet inhibiteur certain qui ne semble pas dépendre de la souche étudiée comme le laissaient supposer les données bibliographiques.

b) Influence du maltose :

Contrairement au glucose, le maltose conduit à une production d' α -amylase pratiquement équivalente à celle du milieu témoin. Ici encore aucune différence notable ne peut être enregistrée soit au niveau de la croissance soit au niveau du pH qui puisse traduire un effet particulier de ce composé en culture. Il semble donc que le remplacement d'une source de carbone complexe comme les maltodextrines par du maltose ne modifie pas de façon très sensible les taux de production. Nos résultats sont donc en accord avec ceux de TONOMURA et coll. (1961) pour qui l'induction de la synthèse nécessite la présence d' α -glucosyl-glucose. Par contre, ils s'éloignent très fortement de ceux de KUNDU et coll. (1972) qui placent par ordre d'efficacité décroissante le glucose suivi du maltose et des maltodextrines.

Cependant, on peut se demander quel type de relation lie le maltose à la synthèse d' α -amylase et en particulier si on peut lui attribuer un effet inducteur à faible concentration. Pour cela nous avons cultivé les souches sur le milieu de référence dont la source de carbone était représentée par du glucose et du maltose en quantités variables. Seul le titre final en α -amylase a été mesuré après 96 heures de culture et la planche 14 exprime l'activité relative de chaque milieu en pourcentage de l'activité due au maltose seul.

Planche 12 : Croissance, évolution du pH et synthèse d' α -amylase de la souche BrBv IV cultivée sur maltose ou dextrines.

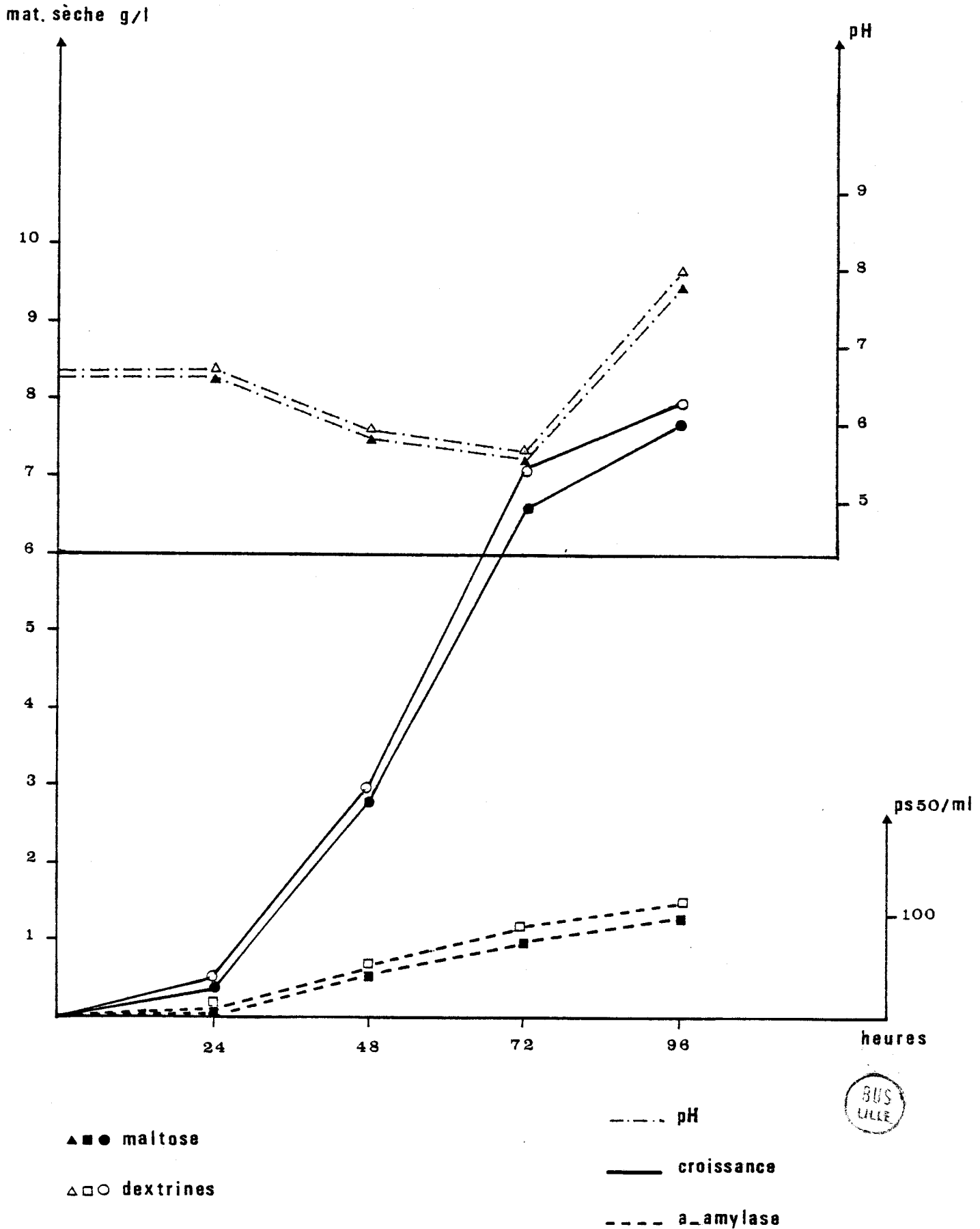


BIS
LILLE

▲ ■ ● maltose
△ □ ○ dextrines

--- α -amylase
— croissance
- . - pH

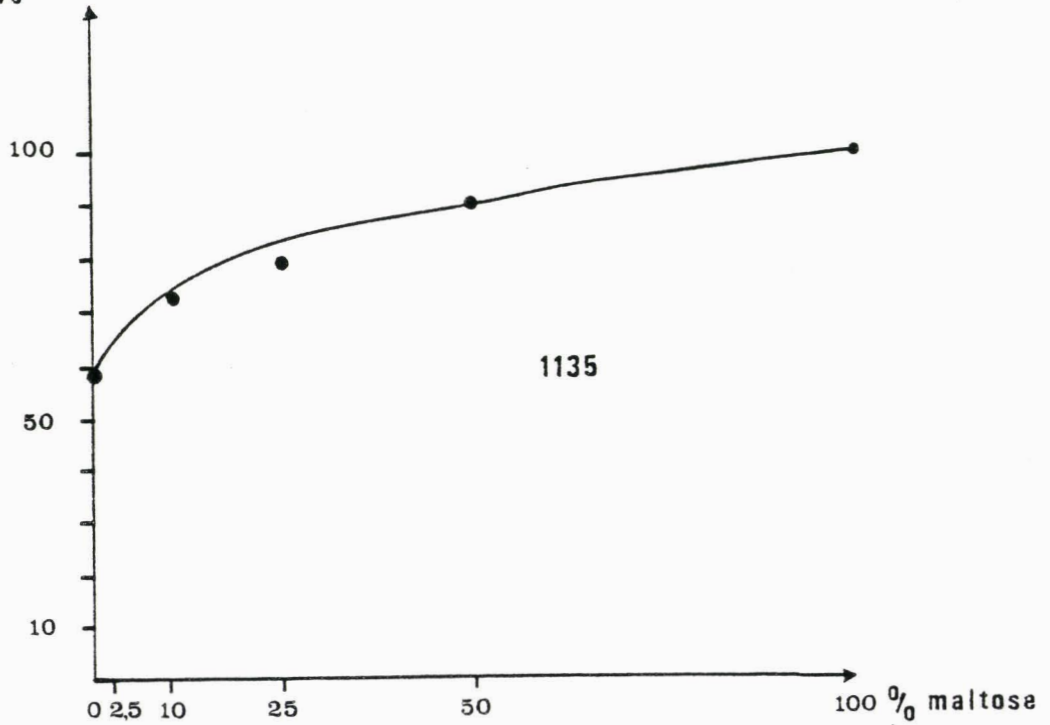
Planche 13 : Croissance, évolution du pH et synthèse d' α -amylase de la souche 1135 cultivée sur maltose ou dextrines.



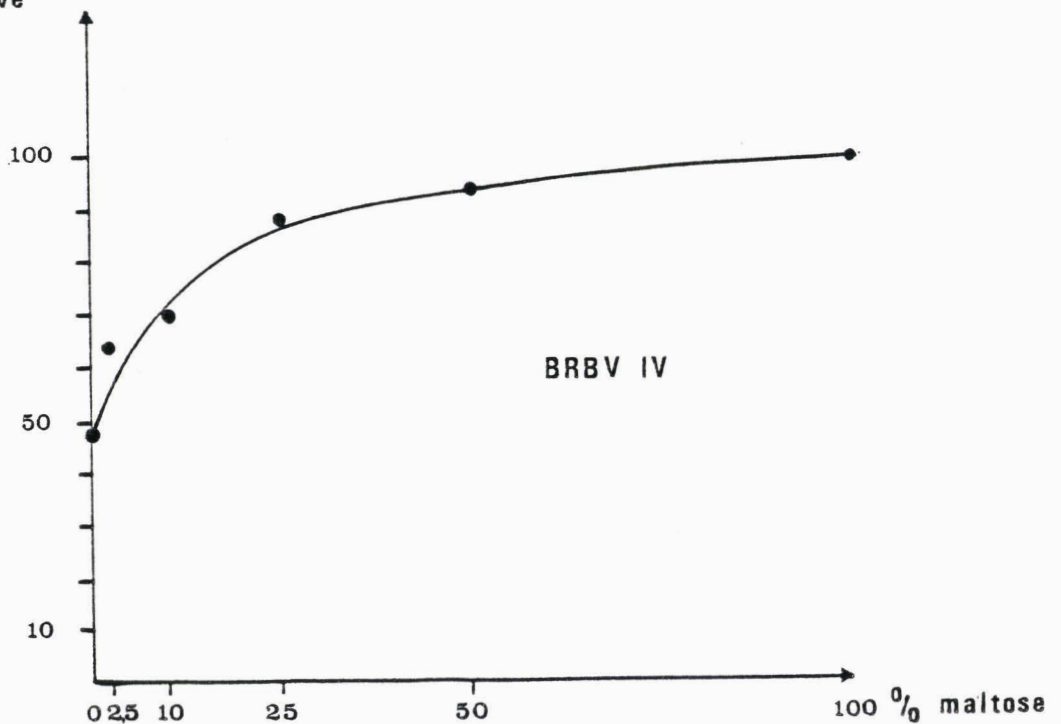
BUS
LILLE

Planche 14 : Activité α -amylase des souches 1135 et BrBv IV cultivées sur le milieu de référence contenant différents rapports glucose/maltose (l'activité est exprimée en % de l'activité due au maltose seul après 96 heures de culture).

activité relative
en %



activité relative
en %



c) Résultats et discussion :

L'observation de ces courbes montre qu'à faible concentration le maltose conduit à une augmentation importante de la synthèse qui atteint 93 % pour la souche BrBv IV et 90 % pour la souche 1135, lorsqu'il intervient pour moitié dans la composition du mélange. Le fait que l'on enregistre dans les deux cas une montée rapide de la synthèse qui se poursuit asymptotiquement pour des concentrations en maltose supérieures à 50 %, indique clairement que l'effet inducteur du maltose est plus important que l'effet inhibiteur du glucose sur la production de l'enzyme. Dans le cas contraire on devrait enregistrer une stagnation de l'activité relative pour les faibles concentrations en maltose suivie d'une remontée importante lorsque sa concentration devient élevée.

On remarque toutefois que si l'allure générale des deux courbes est similaire, l'effet inducteur du maltose semble moins marqué pour la souche 1135 qu'il ne l'est pour l'autre souche. On pourrait cependant considérer de la même façon que l'effet inhibiteur du glucose est plus important ici puisqu'il n'est pas possible de séparer les deux phénomènes. Mais dans ce cas, on s'expliquerait mal pourquoi en présence de glucose comme seule source de carbone, on n'assiste pas à une réduction plus importante de l'activité relative qui demeure de l'ordre de 58 % alors qu'elle n'est que de 48 % pour la souche BrBv IV. En conséquence, le tassement des valeurs que l'on enregistre semble plutôt traduire la sensibilité plus faible de cette souche à la nature du sucre introduit.

Bien que ces résultats aient été vérifiés par une seconde expérimentation, il est difficile d'émettre une hypothèse sur la signification d'une telle réponse dès lors que trop d'inconnues subsistent quant à l'induction et à la régulation de la biosynthèse d' α -amylase chez *Aspergillus oryzae*.

Jusqu'à présent nos résultats ont toujours fait état de grandes similitudes qui semblent indiquer une identité des mécanismes dans chacune des souches mais sans aucun doute des modalités particulières qui puissent rendre compte de leur différence d'activité. Quelle peut être l'importance de la paroi mycélienne dans ces mécanismes ? C'est un des points fondamentaux auquel il est nécessaire d'apporter une réponse.

4) DETERMINATION DU RAPPORT ENTRE α -AMYLASE INTRACELLULAIRE ET EXTRACELLULAIRE

Pour cette expérimentation, nous avons procédé de la manière suivante.

Les cultures sont réalisées sur le milieu de référence contenant des maltodextrines comme source carbonée. Chaque jour le mycélium est recueillie après filtration et lavé plusieurs fois à l'eau distillée afin d'éliminer toute trace d' α -amylase extracellulaire. Il est ensuite transféré dans 50 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 5,5 et maintenu à +4°C dans la glace. Il est alors broyé à l'ultra-turrax pendant environ une minute puis centrifugé. L'activité α -amylase présente à l'intérieur des cultures est exprimée en pourcentage de l'activité totale comprenant le filtrat de culture plus le surnageant de centrifugation. Les résultats que nous avons obtenus sont indiqués dans le tableau ci-dessous et représentent, pour chaque condition, la valeur moyenne de trois échantillons.

Tableau 9 : Activité α -amylase intracellulaire en pourcentage de l'activité totale sur le milieu de référence.

<i>durée d'incubation</i>	<i>24 heures</i>	<i>48 heures</i>	<i>72 heures</i>	<i>96 heures</i>
<i>1135</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>3,2</i>	<i>1,9</i>
<i>BrBv IV</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>1,4</i>	<i>1,7</i>

a) Discussion :

A l'évidence, les résultats que nous obtenons ne permettent pas de justifier l'hypothèse que nous avons formulée. Dans tous les cas, la proportion d' α -amylase présente à l'intérieur des cellules est faible puisqu'au maximum elle représente 3,2 % de l'activité totale. On peut noter à cet égard que les rapports les plus élevés sont mesurés pour la souche 1135, en particulier après 72 heures d'incubation. Le fait que ce soit pour cette souche que l'on enregistre les valeurs les plus fortes est sans doute en faveur d'un rôle actif de la paroi dans la régulation du transport de l' α -amylase. En effet, si l'excrétion de la protéine s'effectuait par simple diffusion, on peut penser

alors que plus sa concentration dans le filtrat serait faible, plus facile serait la diffusion et en conséquence plus faible serait le rapport activité intracellulaire/activité totale. Or, la comparaison des résultats obtenus pour les deux souches montre que c'est précisément le contraire qui se produit. De même, la rétention de l'enzyme à l'intérieur du mycélium devrait être plus importante à 96 heures où sa concentration dans le filtrat est la plus forte. Ici encore, nos résultats montrent qu'il n'en est rien puisqu'au moins pour la souche 1135, c'est à 48 et 72 heures que les rapports sont les plus élevés.

Cependant, cette expérimentation ne permet pas de conclure à un rôle différent de la paroi pour chacune des souches. Les valeurs calculées sont très proches et montrent d'autre part qu'un rapport à peu près constant s'établit entre les concentrations intra et extracellulaires. Dans ces conditions, la seule preuve expérimentale que l'on puisse obtenir ne peut venir que de l'étude d'un système dépourvu de paroi qui nous renseignera sur l'importance réelle qu'elle possède dans la régulation et sur la part qu'on peut lui attribuer dans la différence d'activité des souches. Puisque l'isolement de protoplastes est possible chez les Champignons inférieurs c'est à eux que nous aurons recours dans la suite de cette étude.

b) Conclusion :

Les résultats obtenus en cultures agitées ont montré à la fois de grandes similitudes mais aussi de profondes divergences quant au comportement des souches sur différents milieux.

La souche 1135 apparaît comme ayant une croissance et une production d' α -amylase toujours plus faibles que celles de la souche BrBv IV mais par contre un pouvoir acidifiant beaucoup plus important. L'analyse de nombreuses cultures nous a d'ailleurs permis de montrer que son acidification était étroitement liée à sa croissance et nous en avons conclu que vraisemblablement des différences métaboliques importantes la distinguait de la souche BrBv IV. Cependant, malgré leur physiologie particulière, lorsqu'on les cultive sur différents milieux, la variation des taux de synthèse d' α -amylase se fait toujours dans le même sens et avec une amplitude similaire. De même si la croissance est affectée pour l'une, elle l'est également pour l'autre. Cette homogénéité des réponses laisse donc supposer une identité des mécanismes conduisant à la synthèse d' α -amylase mais également des différences qui puissent rendre compte de leurs activités respectives. Nous les avons recherchées sans succès dans une rétention différente de la protéine à l'intérieur du mycélium car là

encore des résultats très proches ont été observés. Toutefois, de cette expérimentation on ne peut conclure avec certitude sur le rôle exact de la paroi dans l'activité des souches, dès lors qu'elle est constamment présente dans l'expérimentation. L'utilisation de protoplastes devrait au contraire nous permettre de répondre de façon certaine à cette question. Ce n'est pas là leur seul intérêt.

En effet, dans l'étude que nous avons réalisée en cultures agitées, nous ne pouvons pas savoir si la faible activité enzymatique de la souche 1135 n'est pas due, au moins partiellement, à sa croissance ou à son acidification importante. Dans ces conditions, l'étude d'un système où croissance et pH n'interviennent pas dans l'expérimentation, devrait nous permettre une compréhension meilleure des phénomènes qui font de cette souche un faible producteur. Nous verrons donc dans cette seconde partie, comment à l'aide de protoplastes, il est possible de répondre à ces questions.

III. OBTENTION DES PROTOPLASTES CHEZ ASPERGILLUS ORYZAE

1) REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les conditions nécessaires à l'isolement de protoplastes sont très variables d'un organisme à l'autre, mais répondent toutes à un même schéma général. Dans ce procédé, la digestion de la paroi est réalisée par voie enzymatique, dans une solution hypertonique qui permet le maintien de la structure des protoplastes lors de leur formation. Chez les Champignons inférieurs, ils sont généralement isolés à partir d'un mycélium, récolté en début de phase exponentielle de croissance, que l'on incube pendant quelques heures dans un complexe lytique. Les principales difficultés rencontrées proviennent de la mise au point de ce complexe, dont l'efficacité vis-à-vis de la paroi du microorganisme, déterminera pour une grande part, le rendement en protoplastes.

a) Le complexe lytique :

La tendance actuelle est d'utiliser les activités enzymatiques de certains microorganismes pour la préparation du complexe lytique. Parmi ces activités, ce sont essentiellement les chitinases et les β 1-3 glucanases qui sont recherchées, en raison de l'importance de la chitine et des

β -glucanes dans les parois fongiques (PEBERDY, 1980 ; VAN DEN BROEK et coll., 1979). A l'heure actuelle, peu d'espèces sont employées de manière courante pour produire ces deux classes d'enzymes et l'on peut citer surtout l'Ascomycète *Trichoderma harzianum* (PEBERDY et ISAAC, 1976) et l'Actinomycète *Oerskovia xanthineolytica* (VAN DEN BROEK et coll., 1979). Ils sont généralement cultivés sur des milieux semi-synthétiques dont la source de carbone est représentée par de la chitine ou des parois cellulaires de l'organisme dont on désire isoler des protoplastes (HEARN et coll., 1980). Les filtrats de culture obtenus dans ces conditions sont le plus souvent utilisés seuls après une étape de concentration, mais dans certains cas, ils sont supplémentés avec différentes préparations commerciales dont la plus employée est le suc digestif de l'escargot *Helix pomatia* riche lui aussi en β -glucanases.

b) Les autres conditions affectant le rendement en protoplastes :

La production de protoplastes est largement influencée par certains facteurs tels que l'âge du mycélium utilisé pour la digestion, la composition du milieu de culture dans lequel il s'est développé, la nature et la concentration de la solution stabilisatrice. Il semble cependant que seuls les deux premiers points jouent un rôle de facteurs limitants.

Pour VAN DEN BROEK et coll. (1979) les conditions optimales sont réalisées chez *Aspergillus nidulans*, avec un mycélium récolté après 14 à 16 heures d'incubation, dans un milieu contenant 1 % de glucose et du citrate de sodium. Pour ces auteurs, il convient de ne pas augmenter la concentration en glucose du milieu, car ce composé favorise la formation de β 1-3-glucanes dans la paroi mycélienne, qui réduisent d'autant l'efficacité du complexe lytique. Par contre, à la concentration de 1 %, sa présence prévient la formation de mélanine qui semble-t-il ne débute qu'après sa complète disparition. L'action conjointe du citrate de sodium et d'une faible concentration en phosphates permet elle aussi, en diminuant la proportion de β 1-3-glucanes, d'optimiser l'activité lytique.

Ces mêmes auteurs se sont intéressés à l'influence de la solution stabilisatrice sur la formation des protoplastes et rapportent qu'à pressions osmotiques égales, des rendements supérieurs sont obtenus avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et KCl comparés à d'autres solutions osmotiquement stabilisées avec des sels ou des sucres. La concentration de ces solutions, si elle n'est pas critique à l'intérieur de certaines limites, joue cependant un rôle sur la taille et la vacuolisation des protoplastes. Pour des pressions osmotiques faibles

correspondant à 0,1-0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, des protoplastes de grandes tailles fortement vacuolisés sont isolés, alors qu'à 0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ la taille mais aussi le nombre de protoplastes relargués, diminuent.

La revue bibliographique que nous venons de faire, montre que la mise au point d'une méthode d'isolement de protoplastes requière l'étude systématique de nombreux paramètres si l'on veut aboutir à une procédure optimale. Les conditions matérielles ainsi que le temps dont nous disposions pour cette étude, ne nous ont pas permis de les envisager tous. C'est pourquoi nous nous bornerons ici à décrire la méthodologie suivie, en discutant les points sur lesquels elles pourrait être optimisée.

2) RESULTATS EXPERIMENTAUX

Les premières investigations que nous avons réalisées ont été faites à l'aide de diverses enzymes purifiées et de suc digestif d'*Helix pomatia* sous sa forme lyophilisée, l'Helicase (IBF), qui contient de la β -glucuronidase et de la sulfatase.

Ces enzymes ont été employées à des concentrations de 2 mg/ml dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 6 contenant 0,6 M de KCl. Aucun protoplaste n'a été observé pour 100 mg de mycélium et ceci pour les combinaisons suivantes :

- cellulase
- hemicellulase
- chitinase
- helicase
- cellulase + chitinase
- cellulase + helicase.

Seuls de rares protoplastes ont été mis en évidence dans le cas de l'association helicase + chitinase après 3 heures d'incubation à 30°C sous agitation.

La faiblesse de ces premiers résultats nous a poussé à envisager l'utilisation du pouvoir lytique de *Trichoderma harzianum* tel qu'il a été décrit par PEBERDY et ISAAC (1976), HEARN et coll. (1980).

Pour cela, deux souches de *Trichoderma harzianum* ont été obtenues auprès de la mycothèque du Muséum National d'Histoire Naturelle sous les références ATCC 20 476 et Leg ENSA Montpellier.

a) Préparation du complexe lytique :

Nous avons utilisé pour sa préparation un milieu de culture proche de ceux employés par les auteurs précédents qui préconisent l'emploi de chitine comme source de carbone, additionnée soit de frondes de l'Algue brune *Laminaria hyperborea*, riches en laminarine, soit de mycélium de l'organisme dont on veut isoler des protoplastes. Le contenu en laminarine de ces Algues subissant d'importantes variations saisonnières, nous avons préféré utiliser des parois cellulaires d'*A. oryzae* dans notre milieu.

- *Protocole expérimental* : *A. oryzae* est ensemencé en fioles d'erlenmeyer sur le milieu de référence et cultivé pendant 96 heures sous agitation. Après plusieurs lavages à l'eau distillée, le mycélium est congelé, lyophilisé et enfin réduit en poudre.

Le milieu de culture pour *T. harzianum* nous a servi à la fois à la conservation des souches et à la préparation du complexe lytique. Sa composition est la suivante :

- saccharose.....	3 g
- chitine.....	5 g
- mycélium lyophilisé.....	5 g
- NaNO_3	2 g
- KH_2PO_4	1 g
- $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
- KCl	0,5 g
- $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
- eau.....	1000 ml

pH = 6.

Pour la préparation du complexe lytique, le Champignon est cultivé en fioles d'erlenmeyer de 1 litre contenant 200 ml de milieu, à 30°C et sous agitation pendant 96 heures. Le filtrat de culture ainsi obtenu est séparé du mycélium par centrifugation, réduit de moitié à l'évaporateur rotatif à 28°C, filtré une première fois sur filtre Durieux sans cendre puis à nouveau sur membrane millipore (porosité 0,45 μ) et conservé au congélateur à -18°C.

b) Activité du filtrat de *T. harzianum* sur *A. oryzae* :

Une étude préliminaire nous a permis de montrer que la souche dénommée Leg ENSA Montpellier semblait supérieure dans nos conditions d'expérience, aussi avons-nous continué nos travaux avec elle. L'isolement des protoplastes d'*A. oryzae* est réalisé de la façon suivante.

Un mycélium d'*A. oryzae* cultivé sur le milieu de référence pendant 24 heures, est recueilli par filtration, lavé avec 300 ml de KCl 0,6 M et remis en suspension dans le complexe lytique fait d'un volume égal de filtrat de culture concentré de *T. harzianum* et d'un tampon phosphate 0,2 M, pH 6 contenant 1,2 M de KCl, à une concentration de 0,02 g de mycélium par ml de solution enzymatique. Après 3 h 30 d'incubation à 30°C sous agitation, les protoplastes sont séparés des débris mycéliens par filtration sur verre fritté porosité 1.

Afin d'éliminer le complexe lytique, deux centrifugations successives, en présence de NaCl 0,7 M, sont effectuées. Après reprise du culot de centrifugation dans la même solution, le rendement en protoplastes est mesuré d'une part par comptage à l'hématimètre, d'autre part par étalement après dilution, sur un milieu de Czapek contenant 0,5 % d'extrait de levure, rendu hypertonique par du NaCl 0,6 M.

Par cette méthode, environ 10^6 protoplastes sont isolés par gramme de mycélium, ce qui reste nettement inférieur aux résultats de PEBERDY et ISAAC (1976) qui obtiennent chez *A. nidulans* 2 à $2,5 \times 10^{10}$ protoplastes pour 5 g de mycélium, ou encore à ceux de HEARN et coll. (1980) dont le rendement moyen est de 5×10^8 protoplastes pour 4 à 5 g de mycélium d'*A. fumigatus*. Le fait que différents milieux de culture pour *T. harzianum* n'aient pas été étudiés est sans aucun doute la cause principale de notre faible rendement. D'autre part, nous n'avons pas suivi par dosage, les activités chitinase et 1-3-gluconase du filtrat, dont les pics peuvent arriver soit avant, soit après l'arrêt de nos cultures à 96 heures. Aussi, afin d'augmenter la production de protoplastes à un niveau permettant nos expérimentations ultérieures, nous avons supplémenté le filtrat de culture avec 1 % (v/v) de cytohelicase (IBF PHARMAS-INDUSTRIE) qui est une préparation de suc digestif d'*Helix potatia* enrichie en β -glucanase.

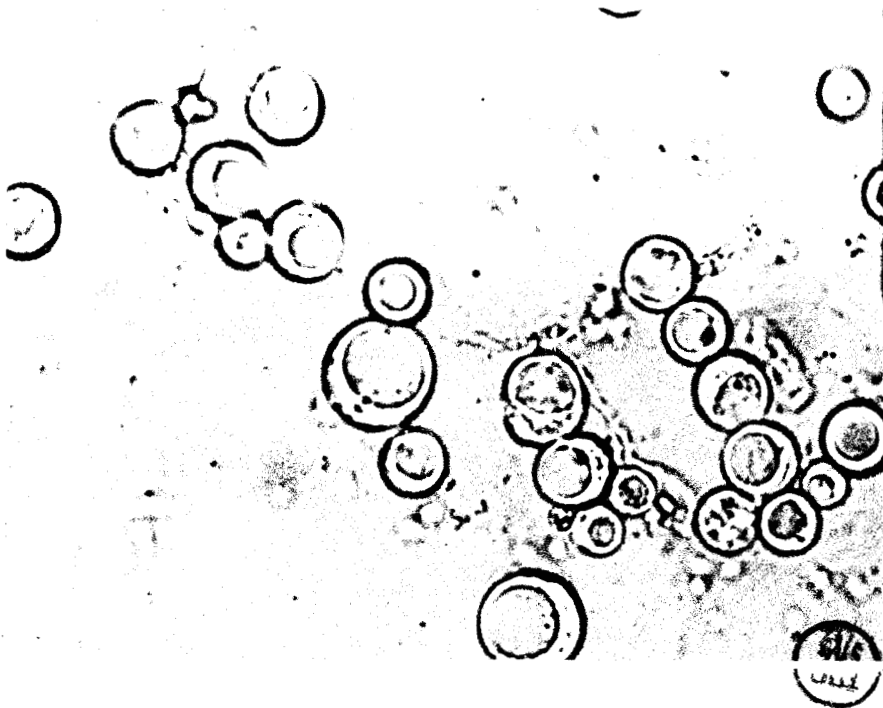
- **Résultats** : L'action conjointe du filtrat de culture de *T. harzianum* et de cytohelicase à 1 % (v/v) permet aujourd'hui, dans les conditions expérimentales décrites précédemment, d'obtenir 10^8 protoplastes pour 3 g de mycélium. Il faut noter d'autre part que l'action lytique de la cytohelicase employée seule à

même concentration ne permet d'atteindre qu'un taux faible de protoplastes sur notre matériel. Le pouvoir lytique de *T. harzianum* apparaît donc indispensable à un bon rendement et des études ultérieures devraient nous permettre de préciser les conditions pour lesquelles ce pouvoir est optimal.

c) Stabilité et régénération des protoplastes :

- *Stabilité* : Observés au microscope après leur filtration sur verre fritté, les protoplastes sont caractérisés par leur petite taille variant de 5 à 10 μ et sont d'autre part fortement vacuolisés. Le nombre et la taille des vacuoles dépend essentiellement de la nature et de la concentration de la solution stabilisatrice employée. Lorsqu'après centrifugation on reprend les protoplastes dans une solution de NaCl 0,7 M, la taille des vacuoles diminue peu à peu et le cytoplasme peut alors remplir les espaces laissés libres. Par contre, si on les conserve pendant 20 heures à +4°C dans le complexe lytique ou dans une solution de KCl 0,6 M, le volume cellulaire des protoplastes s'accroît et l'on remarque le plus souvent une unique vacuole de grande taille qui repousse le cytoplasme contre la membrane plasmique (planche 15). Dans ces conditions, on peut observer couramment des protoplastes dont le diamètre atteint 20 μ .

Planche 15 : Aspect des protoplastes d'*Aspergillus oryzae* après une conservation de 20 heures à +4°C dans le complexe lytique.



- *régénération* : Nous avons suivi la régénération de la paroi en utilisant l'affinité d'un fluorochrome, le calcofluor-white, vis-à-vis de la chitine selon la technique décrite par NAGATA et TAKEBE (1970).

protocole expérimental : après centrifugation, les protoplastes sont remis en suspension dans une solution de KCl 0,6 M contenant 1 % de calcofluor-white et laissés 5 minutes en présence de cette solution. L'excès de colorant est alors éliminé par deux lavages successifs dans du KCl 0,6 M puis les protoplastes sont montés sur lame et observés au microscope en fluorescence.

Lorsqu'ils sont traités au calcofluor juste après leur isolement, aucune fluorescence n'est décelable sur les protoplastes alors qu'elle est parfaitement visible sur les débris mycéliens restant dans la préparation. Il en est de même lorsqu'on les observe après 20 heures à +4°C dans le complexe lytique ou une solution de KCl 0,6 M. Par contre, incubés 8 heures dans un milieu MDO₃, glu Na, Urée diluée de moitié et rendu hypertonique par du NaCl 0,6 M, on observe un début de fluorescence pour environ 50 % des protoplastes. On remarque cependant que la régénération de la paroi n'est pas totale à ce niveau, car les protoplastes restent toujours sensibles à un choc osmotique créé par l'eau distillée.

Sur milieu gélosé, la régénération semble aussi assez rapide. Observés après 24 heures d'incubation à 30°C sur un milieu Czapek contenant 0,6 M NaCl, les protoplastes ont déjà émis 1 ou 2 tubes germinatifs d'une longueur de 100 à 200 µ possédant un nombre restreint de cloisons. Après 48 à 72 heures, des thalles se sont organisés en tous points semblables à ceux engendrés par des conidies. Leur développement ultérieur conduit comme eux à la formation de conidiophores et de conidies morphologiquement identiques.

La viabilité des protoplastes est cependant assez affectée par leur conservation. Lorsqu'ils sont étalés sur milieu gélosé juste après leur formation, pratiquement 100 % des protoplastes régénèrent. Par contre, conservés dans le complexe lytique ou dans une solution de KCl 0,6 M pendant 20 heures à +4°C, une baisse de viabilité de 30 à 40 % est enregistrée. Conservés plus de 48 heures, dans les mêmes conditions, la viabilité devient pratiquement nulle.

3) CONCLUSION

la méthode d'isolement de protoplastes que nous avons mise au point chez *A. oryzae*, permet à l'heure actuelle d'aboutir à des rendements qui se rapprochent de ceux observés par d'autres auteurs, sur des espèces différentes.

Nos résultats montrent cependant qu'une optimisation de cette procédure est sans doute possible en cherchant en particulier à augmenter le pouvoir lytique du filtrat de culture de *Trichoderma harzianum*.

Nous avons vu d'autre part que la régénération de la paroi s'effectuait assez rapidement dans un milieu de culture, comme le milieu MDO₃, glu Na, Urée dilué de moitié, mais que sans doute une dizaine d'heures étaient nécessaires pour que l'ensemble des protoplastes aient opéré cette régénération. De plus, la fragilité de cette nouvelle paroi, attestée par la sensibilité des protoplastes à un choc osmotique, fait supposer que sa structure n'est pas complètement rétablie. La connaissance de ce point particulier est importante pour notre étude puisqu'un de ces aspects est précisément de montrer l'influence de la paroi sur la production d' α -amylase. Il apparaît clairement ici que si l'on veut limiter le phénomène de régénération pour ne travailler qu'avec un matériel dénué de paroi, la durée des expérimentation ne devra pas excéder 8 heures et si possible utiliser des milieux peu concentrés en substances nutritives sans doute moins favorable à une resynthèse rapide de la paroi cellulaire.

Quel peut être le comportement de protoplastes en culture? Leur taux de synthèse en α -amylase? La différence d'activité existant entre nos souches se conserve-t-elle dans un système sans paroi? Telles sont les premières questions auxquelles nous allons essayé d'apporter une réponse.

IV. ETUDE PHYSIOLOGIQUE SUR PROTOPLASTES

1) PROTOCOLE EXPERIMENTAL GENERAL

L'isolement des protoplastes nécessitant un minimum de 5 heures, il n'est pas possible de procéder aux expérimentations dans la même journée, aussi les protoplastes sont-ils conservés dans le complexe lytique pendant 16 heures à +4°C avant d'être utilisés. Ils sont alors centrifugés 20 minutes à 3000 t/mn et lavés deux fois avec une solution de NaCl 0,7 M afin d'éliminer le complexe lytique. Après reprise du culot de centrifugation dans la même solution, ils sont répartis en tubes corex (\emptyset 15 mm-L 100 mm) à raison de

2×10^6 protoplastes par tube puis centrifugés une nouvelle fois. On les remet alors en suspension dans 4 ml de milieu d'incubation et on les introduit dans un portoir incliné fixé à un agitateur. L'incubation s'effectue à 30°C sous agitation modérée. Après des durées variables, les échantillons sont sortis de l'agitateur et centrifugés immédiatement puis le surnageant est récupéré et conservé au congélateur à -18°C avant d'être dosé.

La méthode de dosage que nous utilisons, mettant en évidence les fonctions réductrices libérées par l'hydrolyse de l'amidon sous l'action de l'enzyme, il y a interférence avec les sucres réducteurs apportés par le milieu d'incubation lorsque l'activité enzymatique est faible. Pour cette raison, nous avons fait systématiquement trois tubes pour chaque condition expérimentale dont le surnageant de l'un est porté au bain marie bouillant pendant 10 minutes afin de dénaturer l' α -amylase et sert à contrôler le pouvoir réducteur du milieu. La production d'enzymes est alors calculée par différence entre l'activité réductrice totale et l'activité réductrice du milieu.

2) ETUDE DE LA PRODUCTION D' α -AMYLASE SUR LE MILIEU DE REFERENCE

Puisque nous étions sûr d'obtenir une bonne activité en cultures agitées sur ce milieu, nous l'avons repris ici en le diluant toutefois de moitié, afin de diminuer la concentration en sucres réducteurs tout en conservant le même rapport entre les différents éléments. La pression osmotique du milieu est rendue hypertonique par 0,6 M de NaCl.

Nous avons réalisé plusieurs témoins lors de cette expérimentation. Tout d'abord, nous avons voulu nous assurer que la synthèse d' α -amylase était bien due aux protoplastes eux-mêmes et non à d'éventuels résidus mycéliens qui n'auraient pas été retenus par filtration. D'autre part, nous voulions savoir s'il s'agissait bien d'une synthèse *de novo* et non d'une libération progressive d'enzyme qu'auraient pu contenir initialement les protoplastes. Pour cela, nous avons procédé de la manière suivante :

- certains tubes ont été incubés pendant toute la durée de l'expérience dans 4 ml d'une solution 0,6 M de NaCl au lieu du milieu d'incubation. Ceci nous a permis de déterminer la quantité d'enzymes relarguée par les protoplastes au cours du temps ;
- d'autres tubes ont subi avant incubation un choc osmotique de quelques minutes dans 4 ml d'eau distillée stérile. Après centrifugation, le surnageant nous a servi à mesurer la quantité d' α -amylase présente à l'intérieur des protoplastes.

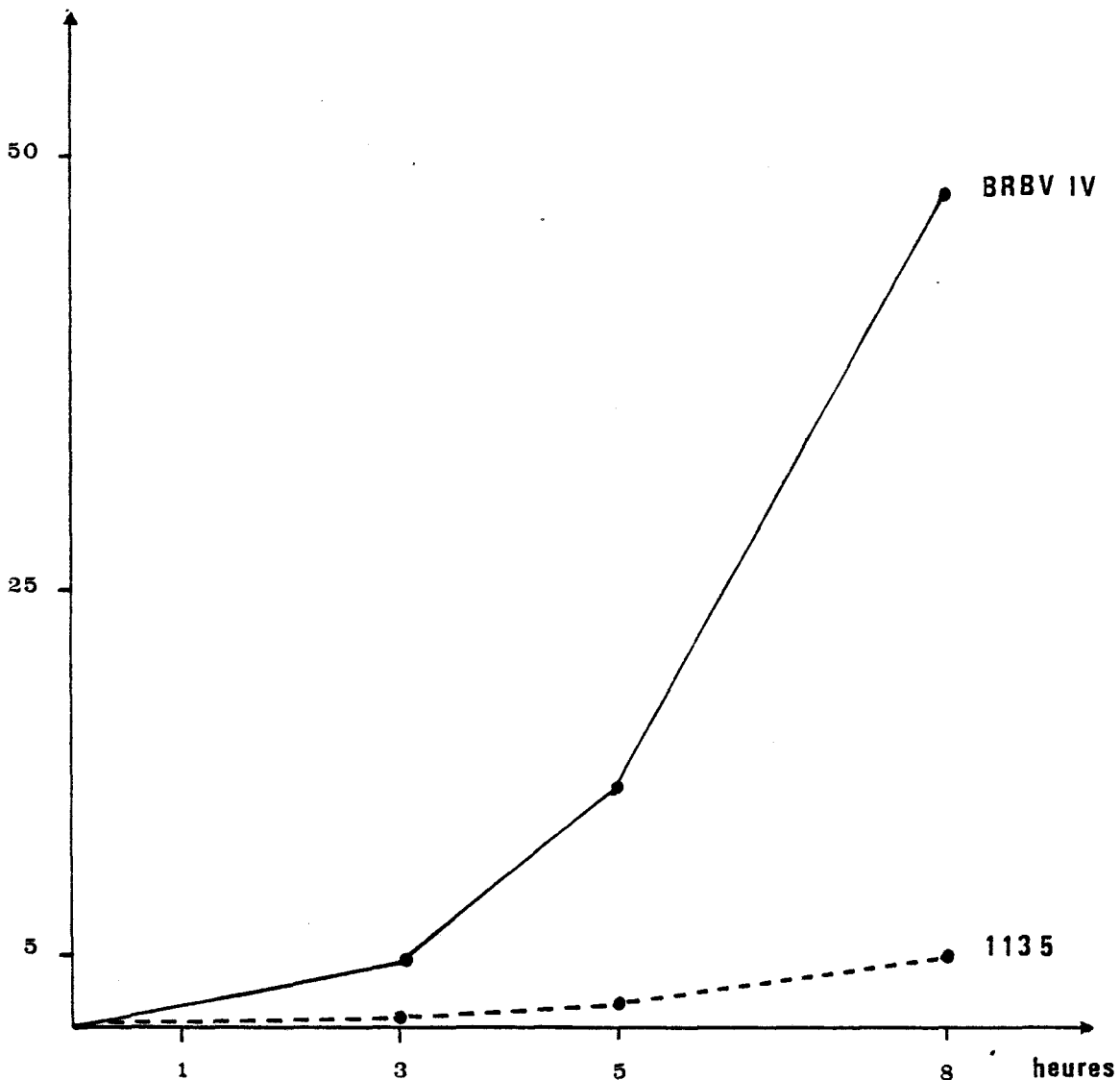
Quant au culot de centrifugation, il a été repris par 4 ml de milieu d'incubation et mis à incuber pendant toute la durée de l'expérimentation afin de voir si une synthèse se produisait même après l'éclatement des protoplastes.

- Résultats et discussion :

La planche 16 représente l'évolution de l'activité α -amylase totale produite par 2×10^6 protoplastes de chacune des souches incubées pendant 3-5 et 8 heures dans les conditions décrites précédemment.

Planche 16 : Synthèse d' α -amylase par des protoplastes BrBv IV et 1135 incubés dans le milieu de référence dilué de moitié.

ps50 / $2 \cdot 10^6$ protoplastes



Les témoins que nous avons réalisés pour cette expérimentation ont confirmé le fait que la synthèse enregistrée est bien due aux protoplastes eux-mêmes. En effet, lorsqu'ils subissent un choc osmotique dans l'eau distillée, aucune activité n'est décelée après 8 heures d'incubation dans le milieu de culture. D'autre part, s'il est possible de détecter des traces d'enzyme à l'intérieur des protoplastes soit par dosage du surnageant récupéré après le choc osmotique, soit par celui de la solution hypertonique de NaCl après 8 heures d'incubation, on ne peut leur attribuer aucune part dans l'activité enzymatique que nous mesurons. Il est clair dans ces conditions qu'il s'agit bien ici d'une synthèse *de novo*.

L'observation des courbes de la planche 16 appelle plusieurs remarques. Tout d'abord l'absence de paroi cellulaire ne semble pas modifier le rapport de production de nos souches qui demeure semblable à celui obtenu en culture agitée sur le même milieu non dilué. Une première conclusion s'impose. Si l'on peut penser que la paroi joue un rôle régulateur vis-à-vis de la synthèse d' α -amylase, comme l'ont montré plusieurs auteurs et en particulier YABUKI et coll. (1977), elle ne peut cependant rendre compte des différences d'activités entre clones. Nous avons toutefois signalé qu'au bout de 8 heures d'incubation dans ce milieu, une quantité assez importante de protoplastes présentent un début de régénération de paroi. Il semble malgré tout que nous puissions négliger ce phénomène dans l'interprétation de nos résultats et ce pour deux raisons. D'abord cette régénération n'est pas complète, puisque les protoplastes restent sensibles à un choc osmotique créé par l'eau distillée. D'autre part, on peut remarquer sur la planche 16 que dès les premiers prélèvements effectués à 3 heures, un écart de production est déjà très net entre les deux souches alors qu'aucune fluorescence n'est encore décelée sur les protoplastes.

Dans ces conditions, on est en droit de penser que la différence d'activité des souches a pour origine un mécanisme interne propre à chacune d'elle mais sans aucun rapport avec la paroi cellulaire.

Si l'on regarde à nouveau le tracé des courbes de la planche 16 et en particulier celui de la souche BrBv IV, on remarque que la synthèse d' α -amylase ne se fait pas à taux constant mais de manière exponentielle. La justification d'un tel type de synthèse dans un système où la croissance est nulle, fait généralement appel à l'hypothèse d'une production nouvelle d'ARN messagers par la cellule. Dans le cas où cette hypothèse serait vérifiée, on

peut se demander alors si la différence d'activité que nous observons ne reflète pas l'efficacité plus ou moins grande des souches à transcrire de nouveaux mARN. Le problème qui nous occupe reviendrait donc à considérer qu'il existe un mécanisme inductif pour la biosynthèse de mARN d' α -amylase et qu'en raison d'évolutions différentes, ce mécanisme ne fonctionnerait pas de manière rigoureusement identique dans les deux souches. C'est pourquoi nous avons entrepris, dans un deuxième temps, d'étudier l'action d'un inhibiteur de la transcription sur la synthèse d' α -amylase.

3) ACTION DE LA 6-METHYL PURINE SUR LA BIOSYNTHESE D' α -AMYLASE

Nous avons employé cet inhibiteur de la transcription dans le milieu MDO₃, gluNa, Urée dilué de moitié. Deux concentrations ont été étudiées : 10 μ g/ml et 100 μ g/ml. Les résultats obtenus pour les deux souches sont représentés sur la planche 17.

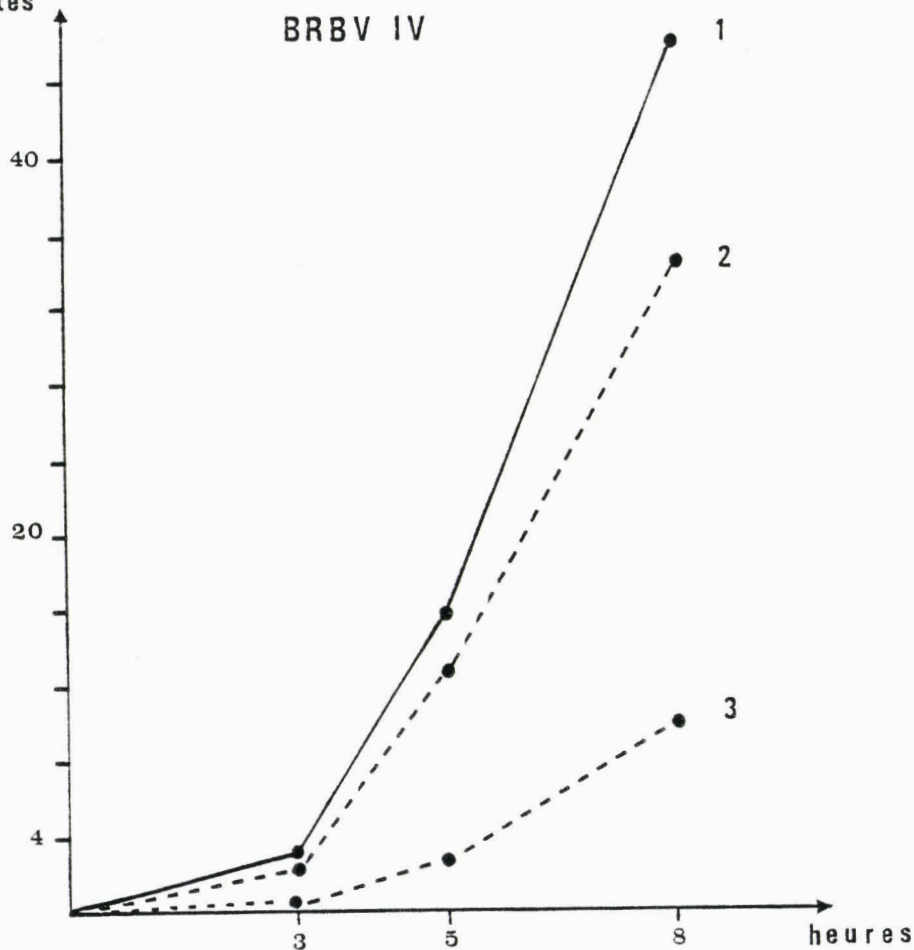
- Résultats et discussion :

A la concentration de 10 μ g/ml, la 6-méthyl purine conduit pour les deux souches à une synthèse proche de celle des témoins mais cependant réduite d'environ 25 %. Par contre, à 100 μ g/ml, seulement 20 % de l'activité est retrouvé pour la souche BrBv IV. Pour la souche 1135, les valeurs enregistrées à cette concentration montrent que seules des traces d'activité sont décelables. Afin de vérifier que la 6-méthyl purine n'affectait pas la viabilité des protoplastes, des témoins, ainsi que des échantillons traités avec 100 μ g/ml, ont été étalés sur milieu gélose après 2 lavages successifs avec une solution de NaCl 0,7 M. Aucune différence de régénération n'a été mise en évidence entre protoplastes traités ou non traités avec la 6-méthyl purine, indiquant par là que la baisse d'activité observée en présence de l'inhibiteur ne peut être imputée à une perte de viabilité.

A la vue de ces résultats, il semble probable que la synthèse d' α -amylase dans les protoplastes nécessite, au moins en partie, de nouveaux ARN messagers. Cependant, le blocage de l'activité n'étant pas total, même pour des concentrations assez importantes d'inhibiteur, il n'est pas impossible que d'autres phénomènes interviennent. On peut penser en particulier à la présence de mARN stables dont l'accumulation dans le mycélium et par suite

Planche 17 : Action de la 6-méthyl purine sur la biosynthèse d' α -amylase de protoplastes BrBv IV et 1135 (milieu de référence dilué de moitié).

ps50 / $2 \cdot 10^6$ protoplastes



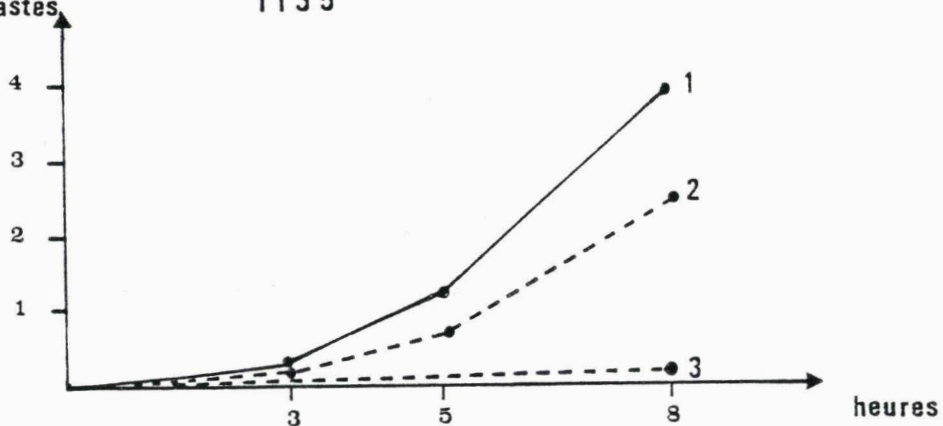
1: témoin

2: 6-méthyl purine 10 µg/ml

3: " " 100 µg/ml

ps50 / $2 \cdot 10^6$ protoplastes

1135



dans les protoplastes, conduirait à une synthèse d' α -amylase en absence de nouvelles transcriptions. De tels mARN d' α -amylase ont été signalés par FENIKSOVA et coll. (1969) chez *A. oryzae* qui ont évalué à environ 12 heures leur durée de vie.

Toutefois, même si un certain "pool" de transcription est présent à l'origine dans les protoplastes sous forme d'ARN messagers stables, on peut penser qu'il n'intervient que pour une faible part dans la synthèse, le principal étant assuré par la production de nouveaux mARN. Ce point est important puisqu'il permet de dire que notre système d'étude est inductible et que vraisemblablement le niveau de transcription sera influencé par les composants du milieu d'incubation. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons repris l'analyse de diverses sources de carbone et en particulier de l'isomaltose afin de préciser leur efficacité réelle dans la synthèse d' α -amylase.

Les travaux de TONOMURA et coll. (1961) ont en effet soulevé un problème important qui concerne l'induction de la biosynthèse d' α -amylase par l'isomaltose ($\text{glc}^{\alpha 1-6}\text{-glc}$). Ces auteurs pensent notamment que ce composé est le véritable inducteur de cette synthèse et qu'il est produit *in vivo* à partir du maltose sous l'action d'une transglucosidase. En conséquence, il était possible d'envisager que la souche 1135, soit par l'absence de transglucosidase, soit par sa présence à un niveau faible, n'était pas capable de produire en quantité suffisante l'isomaltose et par voie de conséquence ne pouvait conduire qu'à des taux modérés d' α -amylase. C'est pourquoi, nous avons entrepris de montrer son efficacité sur nos souches en la comparant à d'autres sources de carbone. Puisque nous avons étudié en cultures agitées l'influence du glucose et du maltose sur la production d'enzyme, nous avons repris ces deux composés dans cette expérimentation.

4) EFFICACITE COMPAREE DU GLUCOSE, DU MALTOSE ET DE L'ISOMALTOSE SUR LA BIOSYNTHESE D' α -AMYLASE

Pour cette expérience, nous avons envisagé de travailler sur des micro-quantités des composés que l'on se proposait d'étudier. On peut penser en effet que les protoplastes sont peu consommateurs d'énergie et qu'un milieu riche, s'il est nécessaire dans le cas où il y a croissance, devient superflu dans le cas contraire. D'autre part, l'utilisation de micro-quantités permet de suivre avec précision leur disparition du milieu de culture et d'avoir ainsi une idée de la vitesse à laquelle ils sont consommés par les cellules.

Planche 18 : Taux de synthèse en α -amylase obtenus après incubation de protoplastes 1135 et BrBv IV pendant 8 heures en présence de glucose, de maltose ou d'isomaltose à 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

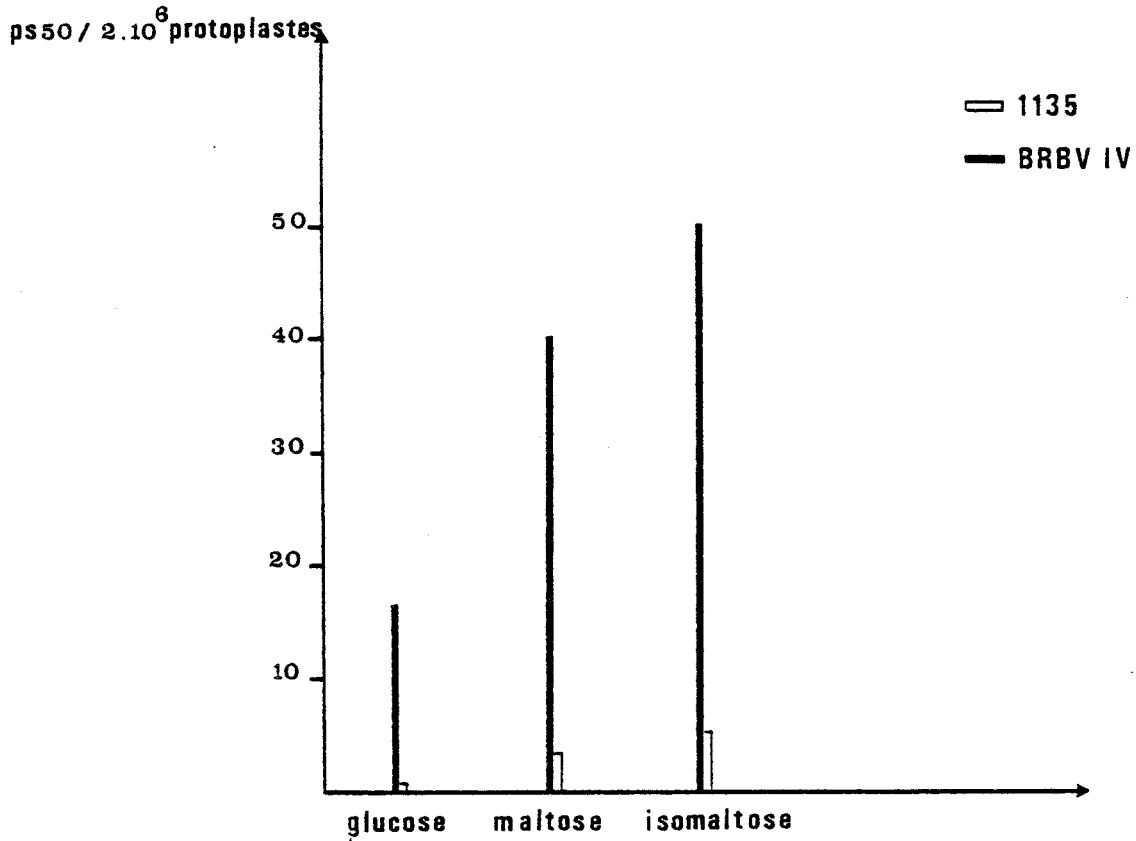
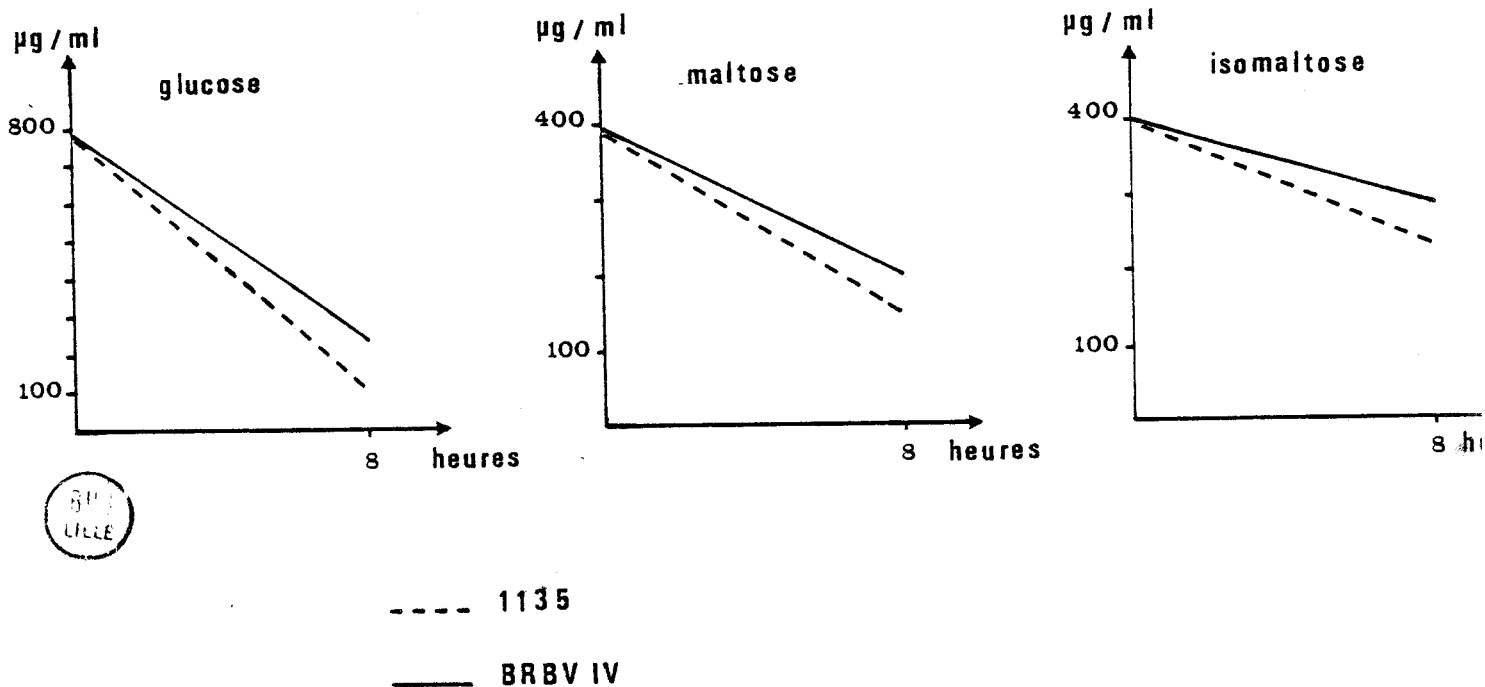


Planche 19 : Consommation du glucose, du maltose et de l'isomaltose par des protoplastes BrBv IV et 1135 après 8 heures d'incubation (valeurs exprimées en équivalents glucose).



a) Protocole expérimental :

Nous avons utilisé comme base du milieu d'incubation une solution tampon phosphate 0,1 M, pH 5,5 rendu hypertonique par du KCl 0,6 M et contenant :

- NaNO_3 100 $\mu\text{g/ml}$
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 $\mu\text{g/ml}$
- CaCl_2 traces.

Pour leur part, les sucres sont ajoutés à ce milieu à raison de 800 $\mu\text{g/ml}$. La multiplicité des conditions ne nous a pas permis de faire une cinétique de la production d' α -amylase pour chaque milieu et chaque souche, qui aurait nécessité une quantité beaucoup plus importante de protoplastes. Aussi, seules les valeurs finales de la production d'enzyme et de la concentration en sucres réducteurs après 8 heures d'incubation, sont représentées sur les planches 18 et 19. Pour le dosage des sucres réducteurs, nous avons employé la méthode de NELSON (1944) et SOMOGYI (1952) sur des filtrats de cultures ayant été portés au bain marie à 100°C pendant 10 minutes.

b) Résultats et discussion :

De l'observation de ces courbes, plusieurs points retiennent l'attention. On note tout d'abord que l'isomaltose conduit dans les deux cas à une production d' α -amylase supérieure à celle obtenue sur maltose. Ceci peut paraître curieux puisque l'isomaltose n'est pas un substrat pour l' α -amylase qui n'hydrolyse que les liaisons α -1,4 et non les liaisons α -1,6. A priori, il ne semble donc pas y avoir de rapport direct entre la présence de liaison α -1,4 et l'importance des taux de synthèse. Par ailleurs, les résultats que nous avons obtenus avec ces trois sources de carbone montrent clairement que cette synthèse est inductible. De plus, d'après les observations précédentes, cette induction est bien le fait de nouvelles transcriptions d'ARNm, dont l'importance est fonction de la structure du sucre introduit. Cependant, même en fournissant de l'isomaltose à la souche 1135, on n'observe pas un accroissement suffisant de la synthèse qui laisserait supposer qu'effectivement ce composé est un inducteur très spécifique comme l'ont suggéré TONOMURA et coll. (1961). Si ce mécanisme était vrai, comment expliquer alors la synthèse d' α -amylase en présence de glucose dès lors que ces mêmes auteurs ont pu montrer qu'*in vivo* l'isomaltose n'est jamais produit à partir de ce composé.

Dans ces conditions, il semble beaucoup plus vraisemblable que les sucres agissent sur la biosynthèse à travers le métabolisme et non par un processus inducteur direct. De nombreux arguments sont en faveur d'un tel modèle et il convient d'en discuter.

Tout d'abord, quelle que soit la source de carbone employée, une synthèse d' α -amylase se produit et ne diffère que quantitativement d'un substrat carboné à l'autre. Par ailleurs, on ne peut rendre responsable de ces différences quantitatives, l'influence de la source carbonée sur la croissance, puisque nous avons vu à l'aide de protoplastes que ces différences se maintiennent dans un système où la croissance est nulle. On sait d'autre part, qu'en fonction de la nature du sucre ou de la source de carbone introduit, certaines voies métaboliques seront favorisées. C'est le cas en particulier de l'acétate qui induit le shunt glyoxylique par la dérégulation de l'isocitratase (SMITH et GUNSALUS, 1955) ou celui du malonate qui bloque l'activité succino-déshydrogénase du cycle tricarboxylique (THORN, 1953).

L'orientation du métabolisme sous l'influence d'un substrat particulier, peut se faire soit dans le sens d'une plus grande oxydation, soit dans le sens d'une plus grande réduction. A cet égard, l'effet répression du glucose sur le fonctionnement des voies oxydatives a été montré à plusieurs reprises et en particulier chez *Aspergillus niger* par NG et coll. (1973). On peut d'ailleurs s'en convaincre en observant sur la planche 19 la vitesse avec laquelle le glucose est consommé par les cellules comparativement au maltose et à l'isomaltose, ce dernier étant le plus lentement métabolisé. Cette remarque prend tout son intérêt lorsqu'on se reporte aux cultures agitées sur le milieu de référence où l'on voit que le glucose, bien que dégradé plus activement, n'engendre pas une croissance supérieure à celle obtenue sur maltose. On peut supposer alors que ce composé conduit à un métabolisme beaucoup moins énergétique que celui imposé par le maltose.

De même, nous avons signalé dans la revue bibliographique, que certains auteurs ont obtenu une augmentation notable de la synthèse d' α -amylase en inhibant partiellement la glycolyse par l'utilisation de sels de fluor tel que NaF qui bloque spécifiquement la 2-phosphoglycérate déshydrogénase (énolase) assurant la transformation réciproque du phosphoénol-pyruvate en 2-phosphoglycérate. Les auteurs remarquent que dans ces conditions, l'efficacité plus faible de la glycolyse se traduit par une consommation moins importante de sucres mais corrélativement par une augmentation sensible de la croissance qui suggère une meilleure utilisation du substrat.

Une relation semble apparaître entre le cycle oxydatif et la biosynthèse d' α -amylase qui est d'autant plus forte que le métabolisme est plus oxydant. L'étude comparative que nous avons menée apporte des arguments supplémentaires.

On constate en effet sur la planche 19 que la souche 1135 consomme plus rapidement le glucose, le maltose et l'isomaltose que la souche BrBv IV, alors qu'en cultures agitées elle a toujours présenté une croissance nettement inférieure. Cette observation montre à l'évidence que son métabolisme est moins énergétique et s'oriente plutôt dans le sens de la réduction que dans celui de l'oxydation. Cette interprétation est supportée par la relation que nous avons mise en évidence, entre croissance et pH en cultures agitées. Le fait que la souche 1135 impose une acidification à tous les milieux de culture au cours de sa croissance, alors qu'un phénomène identique ne se produit pas pour la souche BrBv IV, semble en effet traduire le rejet dans les filtrats cultureux d'acides organiques responsables de cette acidification.

Pour de nombreux auteurs, un lien direct existe entre l'excrétion d'acides organiques et un métabolisme de type réducteur. On peut signaler en particulier les travaux de TACHIBANA et MURAKAMI (1974) qui montrent qu'un rejet important d'acide malique dans le filtrat de *Schizophyllum commune* est la conséquence d'une carboxylation de l'acide phosphoenolpyruvique se produisant en conditions d'anaérobiose partielle. Pour TURIAN (1960a,b) chez *Neurospora crassa*, l'accumulation de ce même acide traduit la dérégulation du shunt glyoxylique qui caractérise un métabolisme de type réducteur.

L'ensemble de ces observations portent à croire que nous sommes en présence de deux souches pour lesquelles le métabolisme est orienté vers deux types opposés, le type oxydatif pour la souche BrBv IV et le type réducteur pour la souche 1135. L'étude en cultures agitées a pu montrer d'autre part que ces caractéristiques étaient stables puisque sur tous les milieux le sens de la variation était identique pour les deux souches. Ceci suppose que l'orientation de leur métabolisme vers l'un ou l'autre type est sous la dépendance d'un contrôle génétique strict qui n'est pas levé lorsqu'on modifie les conditions culturelles.

Il est tentant alors d'apporter une réponse à l'activité α -amylase de chaque souche à travers leur propre métabolisme. La souche BrBv IV, par l'efficacité de ces voies oxydatives, induirait une synthèse d' α -amylase importante. En revanche, leur efficacité plus faible chez la souche 1135 due au fait que les voies réductrices seraient naturellement dérégulées, conduirait, dans des conditions culturelles analogues, à une synthèse d' α -amylase médiocre.

Si un tel mécanisme rendait compte effectivement de l'activité α -amylase d'une souche donnée, l'étude qualitative et quantitative des acides organiques rejetés dans les filtrats culturaux, puis le dosage de certaines enzymes clés du métabolisme oxydatif et du métabolisme réducteur, seraient sans doute d'un grand apport à la compréhension des conditions nécessaires à la synthèse d' α -amylase.

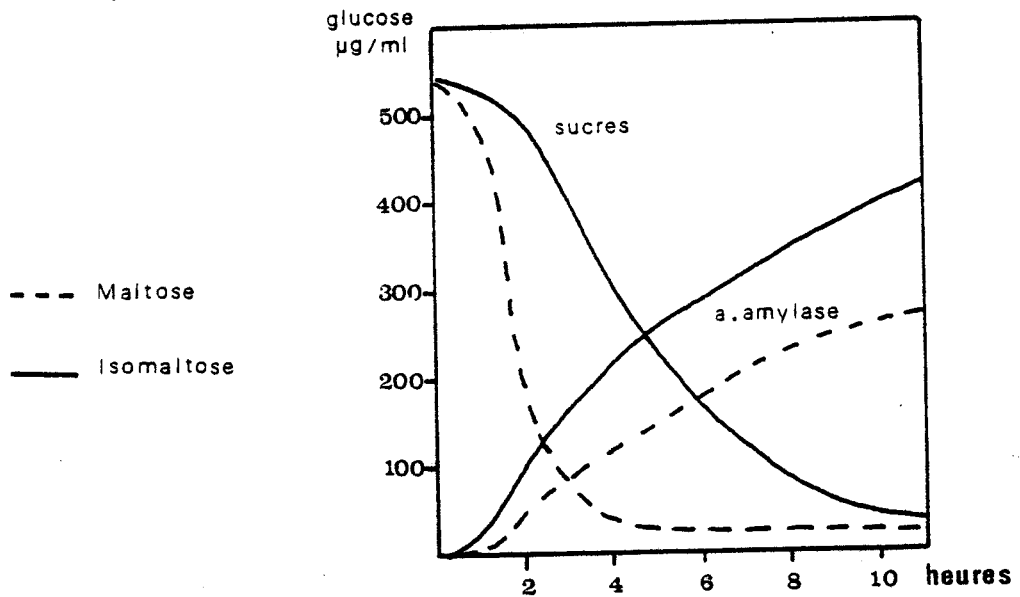
Cependant, il ne nous appartient pas de prendre partie dans la mesure où cette recherche n'a pas été effectuée. Notons toutefois que l'utilisation des protoplastes dans l'étude physiologique a permis de préciser l'influence réelle de certains facteurs tels que la croissance, le pH et la présence d'une paroi cellulaire sur la production d' α -amylase. A cet égard, si nous avons pu vérifier expérimentalement que la présence ou l'absence de paroi ne justifiait pas les taux de synthèse respectifs des souches, en revanche nous avons peu discuté du rôle qu'elle peut avoir sur la régulation et une mise au point est nécessaire.

Nous avons cité à plusieurs reprises dans cette étude les travaux de TONOMURA et coll. (1961) en soulignant qu'ils avaient étudié l'efficacité de nombreuses sources de carbone sur la synthèse d' α -amylase. La méthodologie utilisée par ces auteurs consistait à incuber de petites quantités de mycélium dans un système tampon comprenant l'inducteur à tester et de mesurer l'activité du filtrat sur une période d'environ 10 heures. Ces conditions sont manifestement très proches de celles que nous avons employées à l'exception près que le système étudié comporte dans ce cas une paroi cellulaire.

L'observation des courbes de production d' α -amylase obtenues par ces auteurs et que nous avons reproduites dans la planche 20, fait état d'une différence fondamentale quant à l'évolution de la synthèse au cours du temps. On note en effet que la phase exponentielle ne dure qu'environ 2 heures dans ces conditions alors que pour des protoplastes, si l'on se reporte à la planche 16, on peut voir qu'après 8 heures d'incubation la synthèse est toujours exponentielle.

Les conclusions que l'on peut tirer de ces observations sont doubles. Tout d'abord, il est manifeste que la paroi joue un rôle régulateur puisqu'elle empêche la libre diffusion de la protéine dans le milieu extracellulaire. Cette constatation qui a été faite par certains chercheurs, en particulier YURKEVITCH et KOZYRIOVA (1972), YABUKI et FUKUI (1970) trouve ici une justification supplémentaire. D'autre part, le doute que nous pouvions avoir sur l'influence de la régénération des protoplastes dans notre expérimentation est levé. En effet, il apparaît clairement désormais que même si une régénération partielle intervient au bout de 8 heures d'incubation, le rôle régulateur de cette nouvelle paroi n'est pas encore efficace, puisque dans le cas contraire un arrêt de la phase exponentielle devrait être enregistré.

Planche 20 : Evolution de la synthèse d' α -amylase et de la consommation des sucres par du mycélium d'*A. oryzae* (d'après TONOMURA et coll., 1961).



C O N C L U S I O N

Au cours de cette étude, nous avons pu préciser l'importance de certains facteurs sur la production d' α -amylase. Les données bibliographiques ont orienté nos recherches vers l'étude de l'induction et de la régulation de cette biosynthèse dont plusieurs aspects étaient déjà établis, en particulier l'importance de la source carbonée dans l'induction, la paroi cellulaire dans la régulation. Toutefois, la lecture de ces travaux nous a révélé de nombreuses contradictions entre les différentes équipes engagées dans cette voie. Nous avons pu signaler que le glucose et le maltose avaient été considérés tour à tour comme inducteurs ou inhibiteurs de cette synthèse. De même, si l'importance de la paroi dans la régulation n'était pas contestée, les mécanismes invoqués ne semblaient pas faire l'objet d'un accord. Dans ces conditions, une hypothèse probable était de considérer qu'en raison de leur diversité, les souches utilisées par ces auteurs ne donnaient pas de réponses physiologiques identiques. Aussi avons-nous entrepris une étude comparative afin de voir dans quelle mesure l'emploi de souches très différentes permettait de répondre à cette question.

Les souches BrBv IV et 1135 nous ont été très utiles puisqu'en dehors de leurs différences d'activité α -amylase, des variations métaboliques importantes ont pu être détectées.

A cet égard, les cultures agitées nous ont permis de montrer très rapidement qu'hormis sa production d' α -amylase plus faible, la souche 1135

présentait une croissance inférieure à celle de la souche BrBv IV et acidifiait fortement tous les milieux de culture . L'analyse de nombreux résultats a montré d'autre part que l'acidification était étroitement liée à la croissance de cette souche puisqu'à 48 heures un coefficient de corrélation de $-0,96$ a été calculé entre pH et poids de matière sèche.

Cependant, malgré des comportements en culture tout à fait particuliers, ces deux souches ont fait preuve d'une grande similitude quant aux réponses qu'elles nous ont données lors de modifications des conditions culturelles. Ainsi, cultivées sur glucose, une réduction importante de l'activité α -amylase est enregistrée alors que le maltose restaure pratiquement la production qu'elles ont sur maltodextrine. De même, l'utilisation d'un milieu de culture très différent du milieu de référence s'il modifie profondément la valeur des trois paramètres -croissance, pH et activité-, le sens et l'amplitude des variations demeurent identiques pour les deux souches. Nous en avons donc conclu qu'en dépit de physiologies particulières, une identité des mécanismes qui conduisent à la synthèse d' α -amylase pouvait être invoquée.

Toutefois, il était difficile de savoir quelle part attribuer à la croissance, à l'évolution du pH et au rôle régulateur de la paroi dans la synthèse de cette enzyme dès lors que pour les deux premiers paramètres de profondes divergences existaient. Aussi avons-nous utilisé une autre méthodologie qui permettait de répondre à ces questions dans leur ensemble par l'emploi d'un système sans croissance, où les fluctuations de pH soient nulles ou limitées et dans lequel l'absence de paroi nous renseigne sur son importance réelle en culture.

Les protoplastes se sont avérés particulièrement utiles à la compréhension de ce problème. L'absence de paroi, ou l'absence de régulation sur les parois néoformées, a montré clairement qu'elle ne peut être rendue responsable de la différence d'activité des souches puisqu'un rapport de production sensiblement équivalent est constaté lorsque la paroi est présente ou absente. Cependant, son rôle actif au niveau du transport de la protéine vers le milieu extracellulaire ne peut être nié. Nous avons en effet remarqué qu'un rapport à peu près constant existe entre les concentrations intracellulaires et extracellulaires d' α -amylase, ce qui laisse supposer que l'excrétion de la protéine dans le milieu ne s'effectue pas par simple diffusion. De plus, la comparaison de nos résultats avec ceux de TONOMURA et coll. (1961) a pu établir que dans le cas où il y a présence d'une paroi, la synthèse d' α -amylase n'est exponentielle

que pendant une courte période alors que pour les protoplastes, la phase exponentielle se prolonge au moins pendant 8 heures dans nos conditions d'expérience.

Il était donc nécessaire de chercher ailleurs les raisons de leur différence d'activité. Notre intérêt s'est alors porté vers l'étude plus précise de la synthèse d' α -amylase en montrant, grâce à un inhibiteur de la transcription, que cette synthèse était inductible. Une explication possible de l'activité α -amylase des souches consistait alors à considérer que pour la souche 1135 la production de nouveaux ARN messagers était moindre. Dans ces conditions, nous avons cherché à savoir quel type de relation pouvait lier les sucres à la synthèse d' α -amylase et nous avons pu montrer qu'ils agissaient vraisemblablement à travers le métabolisme en l'orientant soit dans le sens oxydatif soit dans le sens réducteur. L'analyse de nos résultats et des données bibliographiques laisse en effet penser que plus ce métabolisme est déplacé dans le sens de l'oxydation plus la synthèse d' α -amylase est importante. La faible activité de la souche 1135 pourrait alors trouver une explication au niveau métabolique puisqu'il semble que pour cette souche les voies réductrices soient prépondérantes.

Cependant, nous n'avons pas cherché à étudier plus en détail ce mécanisme car un autre aspect du problème a retenu notre attention. Puisque les différences métaboliques observées ne sont en fait que l'expression de différences génétiques, est-il possible d'obtenir par le croisement des souches des clones présentant une recombinaison pour la synthèse d' α -amylase ?. De tels clones seraient d'un intérêt évident pour la poursuite de l'étude physiologique, puisqu'on peut espérer obtenir des stades intermédiaires de production d'enzyme et vérifier sur eux la relation que nous avons mise en évidence entre la synthèse d' α -amylase et l'acidification. D'autre part, d'un point de vue fondamental, il serait intéressant de montrer si des classes de recombinaisons apparaissent ou bien si la variation des taux de synthèse est continue dans la population. Ceci pourrait nous renseigner sur l'importance des modifications qui conduisent la souche 1135 à produire moins d'enzymes que la souche BrBv IV.

Notre matériel se prête bien à une telle étude puisque l'écart entre la production des souches est important et la variance des taux de synthèse faible, de sorte que la reconnaissance d'un stade recombiné pourra en être facilitée. Cependant, *Aspergillus oryzae* ne possédant pas de cycle sexué, la principale difficulté sera l'obtention de clones recombinés qui ne peuvent

être produits qu'à travers son cycle parasexuel décrit la première fois par ISHITANI et coll. (1956a,b) puis confirmé plus tard par THORBEEK et EPLOV (1974). Aussi est-ce à cette méthodologie que nous aurons recours pour obtenir les clones nécessaires à cette étude.

Toutefois, avant de commencer ce travail, nous nous sommes attaché à montrer de façon plus précise que la variation de l'activité α -amylase des souches n'avait qu'une origine quantitative et non qualitative qui aurait pu se justifier par l'existence d'isoenzymes à activités spécifiques différentes. Les résultats que nous avons obtenus font l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE II :

RECHERCHE D'UN POLYMORPHISME EVENTUEL DE L' α -AMYLASE.

INTRODUCTION

Pour de nombreuses activités enzymatiques on peut mettre en évidence, au sein d'une espèce donnée, plusieurs protéines dont les propriétés physicochimiques sont différentes mais qui catalysent la même réaction. Dans certains cas, une étude génétique permet de montrer que ces protéines ne sont en fait que l'expression d'un unique gène de structure dont plusieurs formes alléliques sont maintenues dans la population. Dans ces conditions, il n'est pas rare qu'au niveau de l'activité spécifique de ces isoenzymes des différences existent. Aussi, était-il nécessaire de montrer si pour l' α -amylase un polymorphisme existait qui puisse rendre compte de l'activité des souches d'un point de vue qualitatif. Plusieurs données bibliographiques ont été à l'origine de cette recherche.

I. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

KUNDU et DAS (1970), après avoir purifié l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*, évaluent son poids moléculaire à 56 000 par tamisage et comparent cette valeur à celle de 45 000 obtenue par ROY en 1955 sur une autre souche. Bien que ces valeurs soient proches et que leur différence puisse se justifier par la méthodologie employée, les auteurs concluent cependant à l'existence d'iso-enzymes. Il en est de même pour ANDRZEJCZUK-HYBEL et coll. (1971b) qui, au cours de la purification des enzymes amylolytiques produites en culture par *A. oryzae* notent la présence de trois fractions à activité α -amylase après chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Dans cette étude, le poids moléculaire des protéines n'a pas été mesuré mais les auteurs montrent que les valeurs optimales de pH et les températures d'inactivations sont différentes.

Pour UEDA et coll. (1979) ainsi que FRIEDMANN et EPSTEIN (1967) deux fractions sont également isolées après chromatographie sur DEAE-Cellulose, mais pour ces derniers, rechromatographiées une seconde fois, la séparation n'est plus possible. Cependant, lors d'électrophorèses sur gels de polyacrylamide contenant une faible concentration d'amidon, ils observent la présence systématique de deux zones d'hydrolyse après incubation du gel dans un tampon et coloration à l'iode. Toutefois, ces données bibliographiques nous ont encouragé à rechercher sur nos souches d'éventuelles variations. Cependant, une lourde méthodologie biochimique aurait dépassé le cadre de cette étude. C'est pourquoi nous avons eu recours à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide qui permet la reconnaissance des protéines dès lors qu'une technique de zymogramme est possible.

II. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

1) CONDITIONS GÉNÉRALES DE L'ELECTROPHORESE

Les électrophorèses sont réalisées en gel de polyacrylamide sur un système à plaque (LKB 2117 Multiphor). Le gel est préparé à une concentration de 7,5 % dans un tampon tris-glycine 0,5 M pH 8,9 en présence de persulfate d'ammonium. Après polymérisation, il est démoulé puis conservé 12 heures

à +4°C et à l'abri de la dessiccation avant d'être utilisé. La migration s'effectue dans le même système tampon sous une intensité de 40 mA et à tension constante, développant un champ électrique de 15 Vcm^{-1} . Après 3 heures de migration, le gel est plongé dans une solution d'acide trichloroacétique à 5 % pendant 30 minutes puis coloré dans un bain de Coomassie Brillant Blue R pendant 1 heure. La décoloration s'effectue ensuite dans un mélange méthanol-acide acétique-eau (2,5/1/6,5).

2) MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE α -AMYLASE PAR ZYMOGRAMME

La mise en évidence de l'activité α -amylase en électrophorèse a été réalisée en utilisant la propriété qu'a cette enzyme d'hydrolyser très rapidement l'amidon à l'intérieur de la chaîne carbonée pour donner naissance à des dextrans. Au fur et à mesure de la dextrinisation, la coloration d'un complexe amidon-iodure disparaît pour laisser des zones d'hydrolyses transparentes là où l'enzyme a agi.

La méthode que nous avons employée est dérivée de celle de NORMAN et PRAKASH (1980).

Sur gel de polyacrylamide ayant servi à la migration, un second gel à 5 % contenant 0,2 % d'amidon soluble est déposé, en ayant soin de faire coïncider les lignes de dépôt des échantillons matérialisés sur les gels par de petits puits de 10 μl . Après une incubation de 30 minutes à 30°C, le gel de migration est fixé puis coloré pour les protéines, tandis que le gel à l'amidon est plongé dans une solution iodo-iodurée ($\text{I}_2 + \text{IK } 0,02 - 0,2 \%$) pendant quelques minutes puis fixé dans l'acide acétique à 7 %. Le repérage de la bande correspondant à l' α -amylase se fait en reportant la distance de la ligne de dépôt au milieu de la zone d'hydrolyse sur le gel coloré pour les protéines.

3) PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les premiers essais que nous avons faits à l'aide de filtrats de cultures bruts ne nous ont pas donné une résolution suffisante en particulier pour la souche 1135. Aussi avons-nous envisagé d'augmenter cette résolution par précipitation des protéines du filtrat au sulfate d'ammonium.

- *Protocole expérimental* : Le contenu d'une fiole de culture est filtré sous vide afin d'éliminer le mycélium. Le filtrat est alors centrifugé 30 minutes à 4 000 t/mn et à +4°C puis filtré à nouveau sur membrane millipore (porosité 0,45 μ). A un volume fixé de filtrat maintenu à +4°C par de la glace, on ajoute lentement du sulfate d'ammonium jusqu'à 80 % de saturation. La solution est laissée sous agitation pendant toute une nuit en chambre froide puis centrifugée à 4 000 t/mn 30 minutes. Le culot de centrifugation est repris par 5 ml d'eau distillée et dialysé 48 heures contre de l'eau distillée. Une seconde dialyse est effectuée dans un dialyseur-concentreur (Bio-Block) contre un tampon tri-glycine 0,01 M, pH 8,9 jusqu'à l'obtention d'un volume de 5 à 6 ml. Le dialysat est alors réparti en tubes à hémolyse (Pyrex) à raison de 1 ml/tube, lyophilisé et conservé au congélateur à -18°C.

III. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1) RENDEMENTS ET ACTIVITES SPECIFIQUES

Nous avons obtenu par précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, des échantillons très concentrés qui ont facilité le repérage des bandes en électrophorèse. Au cours de cette procédure, une partie de l'activité α -amylase est perdue, ce qui représente environ 15 à 20 % de l'activité totale du filtrat. L'activité spécifique mesurée soit dans le filtrat brut dialysé, soit après précipitation et dialyse, montre des valeurs à peu près semblables indiquant que la quasi-totalité des protéines a été précipitée par le sulfate d'ammonium. Cependant, pour la souche 1135, les valeurs sont un peu plus éloignées, ceci étant dû au fait que, pour cette souche, une certaine partie du matériel protéique n'est pas remis en solution après précipitation, mais sédimente au fond du boudin de dialyse. Le tableau ci-dessous regroupe l'ensemble des valeurs obtenues, les protéines ayant été dosées par la méthode de LOWRY et coll. (1951) par rapport à une gamme de concentration en sérum albumine de boeuf.

Tableau 10 : Rendements et activités spécifiques des filtrats de culture avant et après précipitation au sulfate d'ammonium.

Souches	Rendement (après précip. et dialyse)	Activité spéci- fique du filtrat brut dialysé	Activité spéci- fique après pré- cipitation et dialyse
1135	80 %	370 PS 50/mg	445 PS 50/mg
BrBv IV	85 %	585 PS 50/mg	615 PS 50/mg

2) ELECTROPHORESES

a) Dépôt d'échantillons :

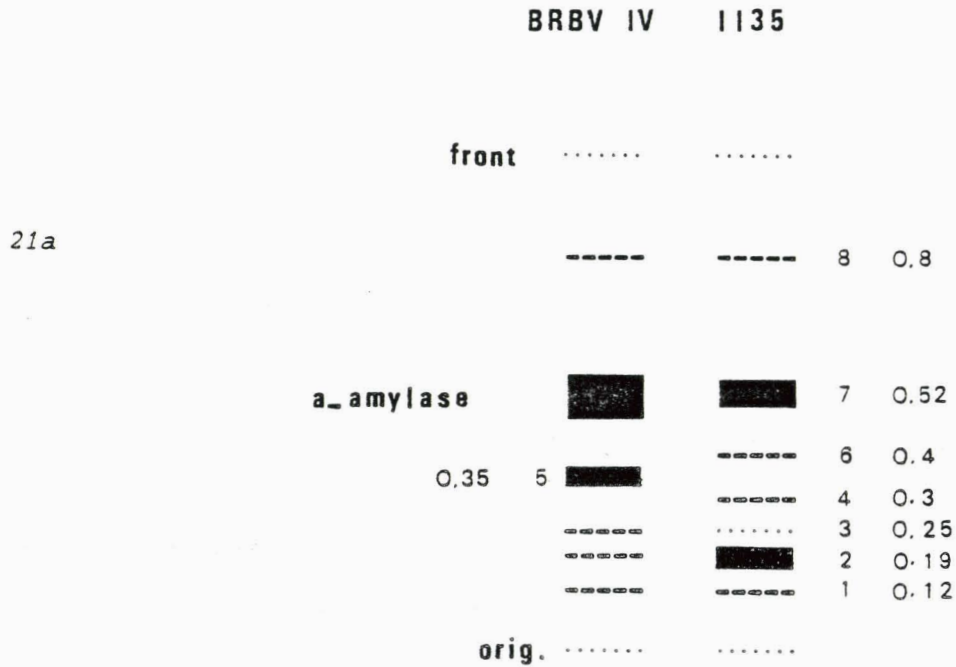
Les protéines lyophilisées sont remises en suspension dans 1 ml d'eau distillée. A une prise d'essai de 250 μ l sont ajoutés 10 μ l d'une solution de bleu de Bromophénol afin de visualiser le front de migration, puis les échantillons sont déposés sur le gel à raison de 10 μ l correspondant environ à 40 μ g de protéine pour la souche 1135 et 200 μ g pour la souche BrBv IV.

b) Résultats :

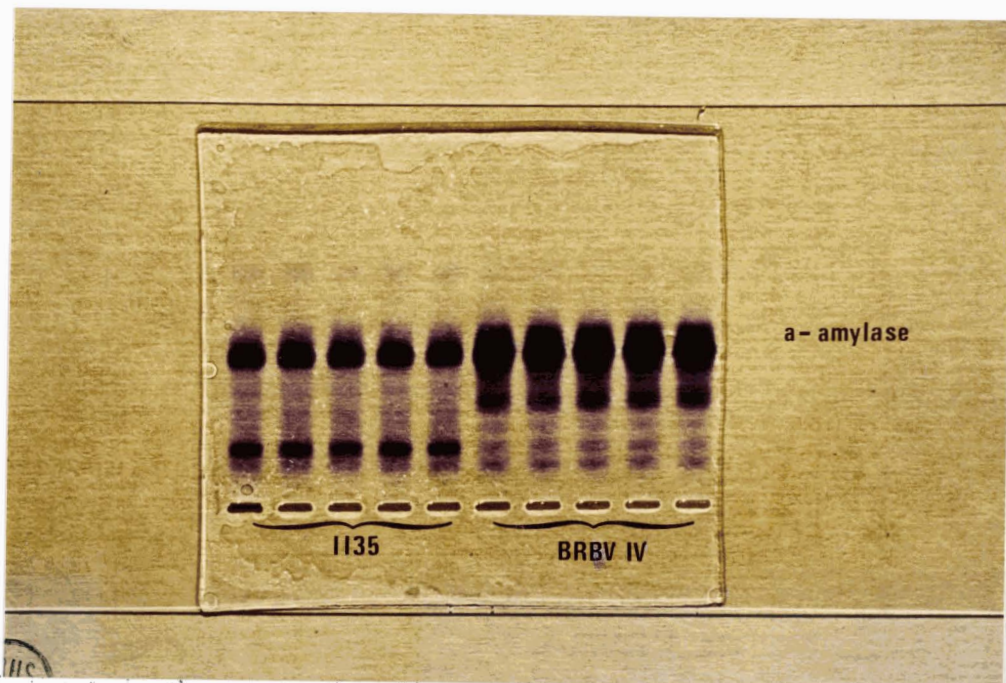
L'observation de plusieurs zymogrammes nous a permis de montrer qu'une seule zone d'hydrolyse est présente laissant supposer l'existence d'une unique protéine à activité α -amylase. Par ailleurs, la position de cette zone étant identique pour les deux souches, il est probable qu'il s'agisse là de la même protéine dans la limite de résolution de la technique. Son identification sur le gel coloré au bleu de coomassie est immédiate, puisqu'en reportant sur ce gel la distance mesurée sur le zymogramme, une seule bande protéique apparaît, la bande 7 de $R_f = 0,52$ par rapport au bleu de Bromophénol.

Bien que des mesures quantitatives n'aient pas été faites, l'observation de la planche 21a montre clairement la présence massive d' α -amylase dans le filtrat de culture de la souche BrBv IV et sa présence bien plus faible dans celui de la souche 1135. Il semble donc que la différence d'activité des souches ne puisse être attribuée à la présence d'isoenzymes plus ou

Planche 21a et b : Diagramme électrophorétique des protéines excrétées dans les filtrats de culture des souches BrBv IV et 1135.



21b



moins efficaces, mais résulte bien de la synthèse d'une même protéine à des taux particuliers.

Lorsque l'on regarde de plus près les bandes séparées par l'électrophorèse, on note également un certain nombre de différences qui peuvent être soit quantitatives comme pour l' α -amylase, soit qualitatives. Dans cette dernière catégorie se placent les bandes 4 et 6 de la souche 1135 qui n'ont pas de correspondance dans la souche BrBv IV et la bande 5 qui n'existe que dans cette dernière (planche 21b). D'un point de vue quantitatif, on remarque d'autre part que pour la bande 2 une quantité de protéines nettement plus importante est visible pour la souche 1135. A un niveau moindre on enregistre également moins de protéines pour la bande 3 de cette même souche.

Nous n'avons pas recherché d'autres activités enzymatiques sur ces gels, mais cependant on peut penser que certaines bandes protéiques appartiennent au groupe des enzymes amylolytiques que produit *Aspergillus oryzae* et en particulier des glucoamylases (UEDA et coll., 1979) et des α -glucosidases (ANDRZEJCZUK-HYBEL et coll., 1971b). Toutefois, même si leur nature reste inconnue, le fait d'avoir mis en évidence certaines variations intéressant les protéines biosynthétisées par ces souches, nous permet d'avoir des marqueurs génétiques sur chacune d'elles qui sans doute pourraient nous être utiles lors des processus de recombinaison mitotique.

C O N C L U S I O N

L'étude électrophorétique des protéines excrétées dans le filtrat de culture a permis de montrer d'une part l'identité structurale de l' α -amylase de deux souches, d'autre part la présence de variations quantitatives ou qualitatives pour certaines bandes protéiques. Le fait que l' α -amylase ait des propriétés similaires quelle que soit la souche indique vraisemblablement que le gène de structure est identique et que seul le niveau de transcription de ce gène rend compte de l'activité respective des souches. L'étude physiologique laissait supposer un tel phénomène, mais cependant sans en apporter la confirmation que nous pouvons en avoir désormais.

Les travaux réalisés dans la partie physiologique nous ont montré l'importance des mécanismes inductifs dans la synthèse, dès lors que la croissance,

le pH des cultures ou la présence d'une paroi sont loin de jouer un rôle primordial dans le processus. De même, l'identité du gène de structure que l'on peut supposer maintenant, apporte un argument supplémentaire au rôle déterminant de ces mécanismes. Toutefois, nous n'avons aucune idée de l'ampleur des modifications métaboliques qui conduisent une souche à produire moins d'enzymes qu'une autre et inversement. Dans ces conditions, l'étude de clones recombinés devrait nous permettre d'une part de voir si le caractère de production d' α -amylase est recombinable et, si oui, quels types de recombinés obtient-on ?. En d'autres termes si recombinaison il y a, la production d' α -amylase se distribue-t-elle de façon continue entre les bornes que forment les souches parentales ou bien peut-on mettre en évidence des classes de recombinés ayant même production qui signifierait sans doute qu'un nombre plus restreint de gènes intervient dans le processus d'induction ?.

2^{eme} PARTIE

CHAPITRE I :

HETEROCARYOSE ET RECOMBINAISON MITOTIQUE.

INTRODUCTION

Classiquement, l'obtention de lignées recombinaisonnées chez les Eucaryotes est le fait de la méiose qui assure à la fois un brassage des chromosomes par une distribution aléatoire dans les cellules-filles et leur remaniement par l'intermédiaire des "crossing-over". Mais chez de nombreux Champignons inférieurs, l'absence de méiose pose un problème et dans certains cas, même si elle existe, elle ne peut rendre compte à elle seule de l'étendue de la variation intraspécifique telle qu'on peut l'observer dans la nature.

Par conséquent, pour ces organismes, l'apparition de combinaisons génétiques nouvelles ne peut être assurée que par un processus purement somatique. C'est à PONTECORVO (1956) que nous devons la première étude de détail du cycle parasexuel, chez l'Ascomycète *Aspergillus nidulans*. De ces travaux, il ressort que trois phases sont nécessaires à son accomplissement :

- 1) réunion dans un même cytoplasme de noyaux génétiquement différents ;
- 2) fusion de ces noyaux conduisant à un doublement de la ploïdie ;
- 3) retour à l'état initial de ploïdie.

Chez *Aspergillus nidulans*, les produits recombines proviennent de deux événements. D'une part de "crossing-over" mitotiques qui se produisent dans les noyaux fusionnés, d'autre part de la perte successive de chromosomes dans ces mêmes noyaux assurant le retour à la ploïdie primitive par différentes étapes aneuploïdes.

A la suite de ces travaux, l'existence d'un cycle parasexuel a pu être montrée chez de nombreuses espèces, en particulier *Aspergillus niger* (LHOAS, 1961), *Verticillium-albo atrum* (HASTIE, 1967), *Aspergillus parasiticus* (BENNETT et coll., 1980). Dans tous les cas, le schéma général s'est avéré identique, seules la durée de chacune des étapes et l'efficacité avec laquelle ce cycle s'effectue, sont différentes.

Chez *Aspergillus oryzae*, les travaux d'ISHITANI et coll. (1956a,b) puis ceux de THORBEC et EPLOV (1974) ont permis de préciser les modalités d'exécution des différentes étapes du cycle et constituent à l'heure actuelle les seules données concernant la parasexualité de cette espèce.

En l'absence d'un cycle sexué connu, il semble donc possible d'obtenir de nouvelles combinaisons génétiques chez *Aspergillus oryzae*, par la voie parasexuelle et ainsi d'avoir à notre disposition les clones nécessaires à notre étude.

I. HÉTÉROCARYOSE

1) LES MUTANTS

L'étude du cycle parasexuel est grandement facilitée par l'emploi de souches marquées génétiquement qui permettent de s'assurer avec précision des différents événements nucléaires ayant lieu au cours du cycle. Il est évident que plus le marquage est dense, plus les informations seront précises, mais corrélativement la multiplicité des mutations sur un même génome entraîne des modifications profondes de la physiologie, de l'aptitude à croître ou à sporuler. Ce phénomène s'est avéré très limitant pour le choix des mutants et nous avons préféré n'utiliser que des souches à un seul marqueur qui d'ailleurs ont toutes présenté une baisse sensible dans la production d' α -amylase, comparativement aux souches sauvages.

L'agent mutagène que nous avons retenu pour la sélection des mutants auxotrophes a été le rayonnement ultra-violet qui conduit en général à des modifications profondes de l'ADN entraînant peu de réversions vers la prototrophie. Son activité biologique est la formation de dimères de thymine qui, s'ils ne sont pas excisés, conduisent à un arrêt de la transcription. L'efficacité de cet agent mutagène est due en réalité aux capacités de réparation de la cellule. En effet, certains systèmes enzymatiques sont capables de dissocier les dimères de thymine et de rendre ainsi à l'ADN sa structure primitive. Ils sont généralement photoactivés et il est donc important de travailler à l'obscurité si l'on veut les inhiber. Les autres systèmes de réparation conduisent eux à des erreurs plus ou moins grandes et sont de fait les véritables responsables de l'action mutagène du rayonnement ultra-violet. Il s'agit en particulier des systèmes "excision-resynthèse" et "post-répliatif" largement distribués dans le monde vivant et qui conduisent soit à des erreurs d'appariement entre paires de bases dans le premier cas, soit à des recombinaisons entre deux doubles hélices dans le second.

La procédure de sélection et d'identification décrite au chapitre I "Matériel et Méthodes", nous a permis d'isoler de nombreux mutants dont la plupart se sont avérés auxotrophes vis-à-vis d'un acide aminé. Le taux de survie très faible (< 1 %) que nous avons pratiqué, du à une irradiation importante et nécessité par l'état plurinucléé des conidies d'*A. oryzae*, a rendu certains mutants inaptes à toute expérimentation. En effet, leur croissance faible sur milieu complet au malt ou sur milieu minimum supplémenté avec le facteur de croissance requis, ainsi que leur absence de sporulation, nous ont conduit à les éliminer. Nous n'en n'avons donc retenu qu'un petit nombre :

- pour la souche 1135 :

-168 : adénine⁻
 - 35 : lysine⁻
 - 78 : leucine⁻
 - 41 : lysine⁻
 - 27 : leucine⁻
 - 13 : méthionine⁻
 -279 : histidine⁻
 -239 : lysine⁻

- pour la souche BrBv IV :

-381 : arginine⁻
 -112 : histidine⁻
 - 56 : arginine⁻
 -132 : leucine⁻
 - 28 : arginine⁻
 -388 : adénine⁻

Comme on peut le remarquer, certains phénotypes apparaissent avec une fréquence plus élevée. C'est le cas en particulier des mutants lysine⁻ par la souche 1135 et des mutants arginine⁻ pour la souche BrBV IV. Ce phénomène semble être assez fréquent chez de nombreux organismes et dépendre à la fois de la souche et de l'agent mutagène utilisés. Un cas extrême est celui rencontré chez la levure pour laquelle les mutations "petites" sont induites dans le génome mitochondrial à environ 100 % par le bromure d'éthyldium.

La chaîne de biosynthèse de l'argine étant bien établie chez *Neurospora crassa* et *Saccharomyces cerevisiae* (revue dans FINCHAM, 1979) nous avons entrepris de voir si les trois mutants arginine⁻ en notre possession étaient bloqués aux mêmes sites. Pour cela, nous avons testé leur aptitude à pousser sur milieu minimum + citrulline, composé intervenant dans l'avant dernière étape de cette chaîne. Les résultats sont les suivants :

Tableau 11 : Croissance des mutants arginine^o sur MM et MM supplémenté avec arginine ou citrulline (100 mg/l).

	MM	MM + Arg	MM + Citrull.
381	0	+	0
56	0	+	+
28	0	+	0

0 : pas de croissance - + : croissance.

Le résultat de ce test nous permet de voir que la citrulline supplée l'auxotrophie du mutant 56, mais ne supplée pas les auxotrophies des mutants 381 et 28, alors que sur arginine, la croissance des trois souches est normale. On peut donc conclure que dans la chaîne de biosynthèse, la mutation induite chez le mutant 56 est placée avant la citrulline alors que pour les deux autres souches elles sont placées après. Il ne s'agit donc pas, dans ces deux cas, de mutations alléliques, mais de mutations affectant des gènes différents, impliqués dans la même chaîne biosynthétique.

2) REALISATION DES ANASTOMOSES

La technique que nous avons employée pour l'obtention d'hétérocaryons est celle des semis linéaires schématisée sur la planche 22.

Les souches d'*Aspergillus oryzae* sont capables de prélever les éléments nécessaires à leur croissance à travers un film fin de cellophane qui n'empêche pas la diffusion des petits métabolites. Nous avons donc utilisé cette propriété pour réaliser les confrontations entre mutants.

Sur une boîte de pétri contenant un milieu complet (Czapek + extrait de levure 5 g/l), on dépose stérilement une feuille de cellophane en ayant soin de la faire adhérer complètement à la surface du milieu. On place alors côte à côte deux fils de coton d'environ 50 mm de long, chacun d'eux étant trempé dans un broyat mycélien différent, correspondant aux deux mutants que l'on désire faire fusionner. L'intérêt de la cellophane est de concentrer dans un même plan les hyphes mycéliens qui ne peuvent alors surmonter cette barrière et s'enfoncer dans la gélose.

Il s'en suit une densité très importante d'hyphes ne laissant entre eux que peu d'espace libre et se développant de manière parallèle. Après 36 heures d'incubation, les filaments de chacun des mutants se sont rencontrés et la feuille de cellophane peut être alors transférée sur milieu minimum. Au cours de l'incubation qui suit, on note un arrêt total de la croissance pendant 5 à 6 jours, puis sur certaines boîtes une croissance sectorielle apparaît prenant naissance au niveau de la zone de contact des filaments. Après 3 à 4 jours, ce secteur a atteint la gélose et l'on peut le prélever afin de vérifier sa nature hétérocaryotique.

- *Résultats expérimentaux* : Les croisements réalisés entre paires de clones mutants n'ont pas tous donné naissance à des secteurs prototrophes. Seuls ceux indiqués dans le tableau 12 ont été à l'origine de tels secteurs. Il faut souligner qu'ils intéressent tous les mutants issus de la souche 1135. En effet, aucun secteur n'est apparu entre mutants de la souche BrBv IV ni lors de confrontations impliquant les mutants des deux souches.

Ce phénomène qui s'est avéré d'emblée très défavorable à notre étude, peut s'expliquer par la rareté des anastomoses naturelles ayant lieu dans la souche BrBv IV. L'aptitude à l'autoanastomose est en effet un facteur décisif pour l'établissement d'une croissance hétérocaryotique, puisqu'elle indique qu'aucune

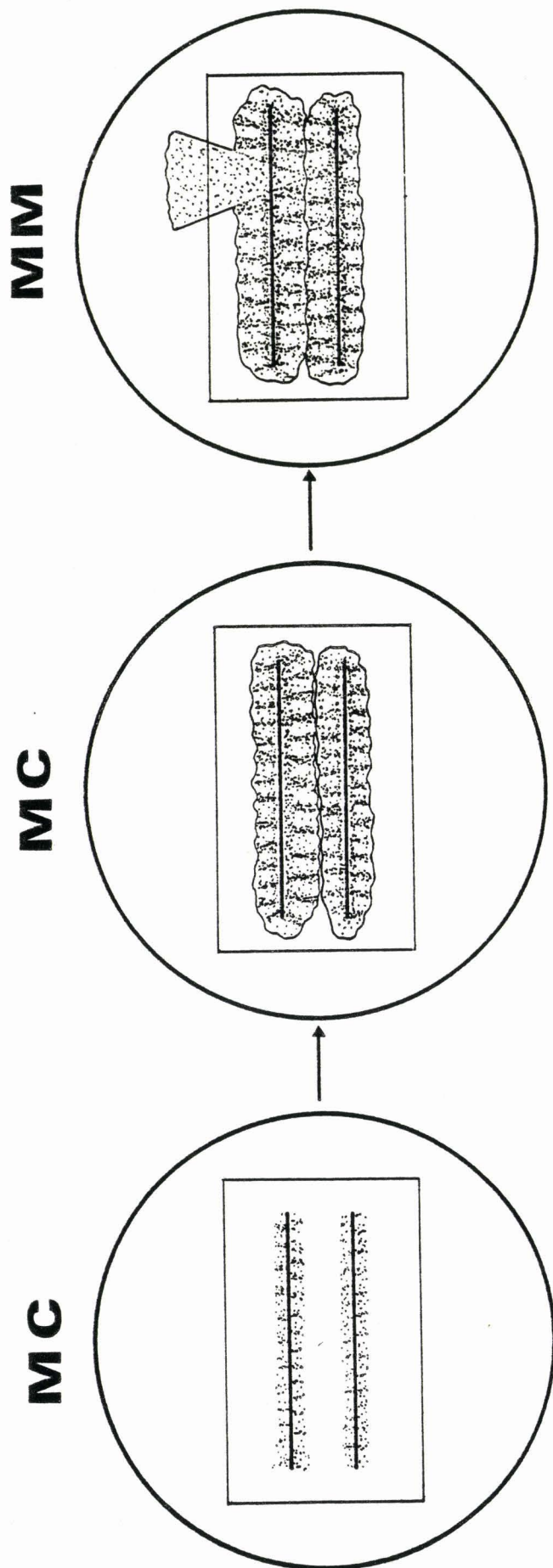


Planche 22 : Schéma d'obtention des secteurs
prototrophes par confrontation de thalles
mutants.

**TRANSFERT SUR MM APRES 36 HEURES
D'INCUBATION**

barrière n'existe à la lyse des parois. Il convient de remarquer que ce phénomène n'est pas particulier aux souches que nous avons employées, ni à l'espèce *A. oryzae*. MAKOUNZI (1978) chez *Pyricularia oryzae* l'a rencontré de manière identique et a montré que là aussi la déficience en autoanastomoses en était la cause.

Il faut supposer en outre, que cette lyse ne peut être induite par un seul des deux parents impliqués dans le croisement, car alors les confrontations entre mutants issus des deux souches devraient conduire nécessairement à la formation d'hétérocaryons. Cependant, la réalisation d'hétérocaryons entre souches d'origines différentes n'est pas toujours possible. GRINDLE (1963a,b) a montré chez *Aspergillus nidulans* l'existence de groupes d'incompatibilité entre souches de provenance diverse, mais dans son cas, les mutants issus d'un même isolat conduisaient toujours à la formation d'hétérocaryons. Il semble donc que la réalisation d'une association hétérocaryotique viable entre souches différentes soit soumise à deux facteurs dont nous ne pouvons encore évaluer l'importance respective sur nos souches: d'une part de l'aptitude des souches à s'autoanastomoser, d'autre part de l'absence d'incompatibilité.

A la suite de ces premiers résultats, nous avons donc choisi de mener conjointement l'étude du cycle parasexuel à partir des secteurs prototrophes en notre possession afin d'en préciser les différentes modalités et la recherche d'une technique appropriée, permettant d'initier l'hétérocaryose entre nos deux souches. Puisque la voie naturelle des anastomoses ne permet pas son établissement, nous avons envisagé de la réaliser par fusion de protoplastes. Cette technique ainsi que les résultats obtenus, seront décrits dans un autre chapitre.

Tableau 12 : Confrontations entre paires de mutants auxotrophes issus de la souche 1135, ayant produit des secteurs prototrophes.

	168 <i>ade⁻</i>	41 <i>lys⁻</i>	35 <i>lys⁻</i>	239 <i>lys⁻</i>
78 <i>leu⁻</i>	⊕	+	+	+
27 <i>leu⁻</i>	+	⊕	+	+
279 <i>his⁻</i>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>

+ : secteurs à croissance rapide - + : secteurs à croissance lente
 ⊕ : confrontation étudiées.

3) ETUDE DES SECTEURS PROTOTROPHES

Les secteurs issus des boîtes de confrontations ont déjà à ce niveau une forte probabilité d'être de nature hétérocaryotique. Tout d'abord, les témoins réalisés en confrontant de manière identique une même souche mutante n'ont jamais présenté de croissance sectorielle, il est donc peu probable que leur apparition résulte de la réversion spontanée de l'un ou l'autre des marqueurs vers la prototrophie. Un deuxième point semble attester la fusion : c'est la forme sectorielle de la croissance. En effet, si la complémentarité des deux mutants s'effectuait par l'intermédiaire du milieu de culture, en supposant un échange de métabolites d'une souche vers l'autre, ce phénomène devrait intéresser l'ensemble de la zone de contact des filaments et non se localiser sur certains points.

a) Stabilité des hétérocaryons :

Les secteurs prototrophes isolés à partir de confrontations entre mutants issus de la souche 1135 n'ont pas tous présenté une bonne croissance. C'est le cas en particulier des croisements dans lesquels était impliqué le mutant 279 (his^-). Nous avons donc sélectionné parmi les confrontations réussies, deux secteurs qui montraient une croissance rapide, correspondant aux associations ade^- (168) x leu^- (78) et lys^- (41) x leu^- (27).

Afin de déterminer avec certitude leur nature hétérocaryotique, nous avons entrepris de tester leur stabilité sur milieu minimum et sur milieu complet, puis de faire l'analyse des conidies issues de différentes générations asexuelles.

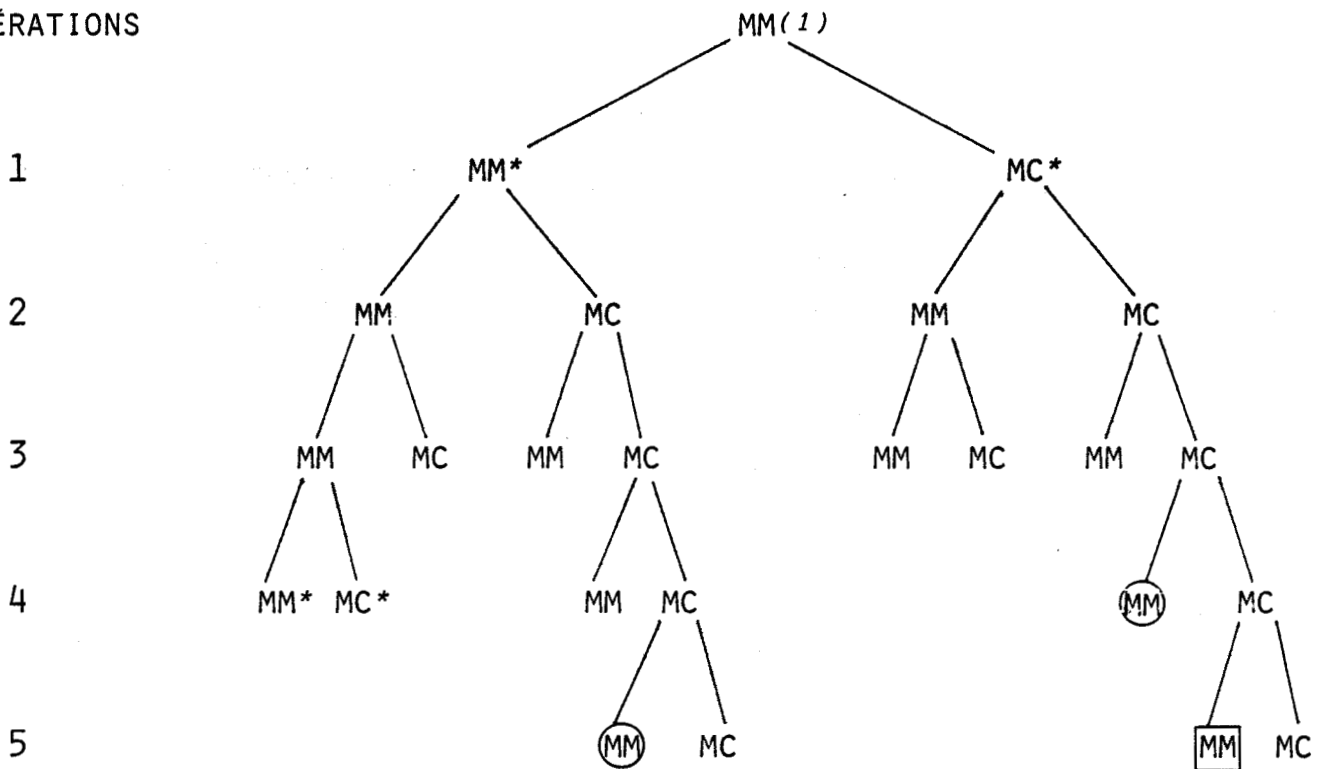
Le maintien du stade hétérocaryotique nécessite un milieu de culture sur lequel l'hétérocaryon ait un avantage sélectif par rapport aux homocaryons mutants. Ces conditions sont réalisées sur milieu minimum, mais ne le sont pas sur milieu complet. Dans ce cas, l'hétérocaryon a tendance à ségréger en redonnant naissance aux clones parentaux mutants.

- *Protocole expérimental* : des boutures sont prélevées à la périphérie des secteurs prototrophes et transférées à la fois sur milieu minimum (MM) et sur milieu complet (MC). Cette première étape constitue la génération 1 sur les planches 23 et 24. A chaque nouveau transfert, on procède de manière identique et l'on note si il y a ou non croissance sur milieu minimum.

Les résultats montrent que pour la confrontation ade^- (168) x leu^- (78) deux passages sur MC suffisent à induire un début de ségrégation qui devient alors

Planche 23 : CROISEMENT LYS^- (41) x LEU^- (27)

GÉNÉRATIONS



Légende :

$MM^{(1)}$: milieu minimum correspondant aux boîtes de confrontation.

\textcircled{MM} : absence de croissance sur certaines boîtes.

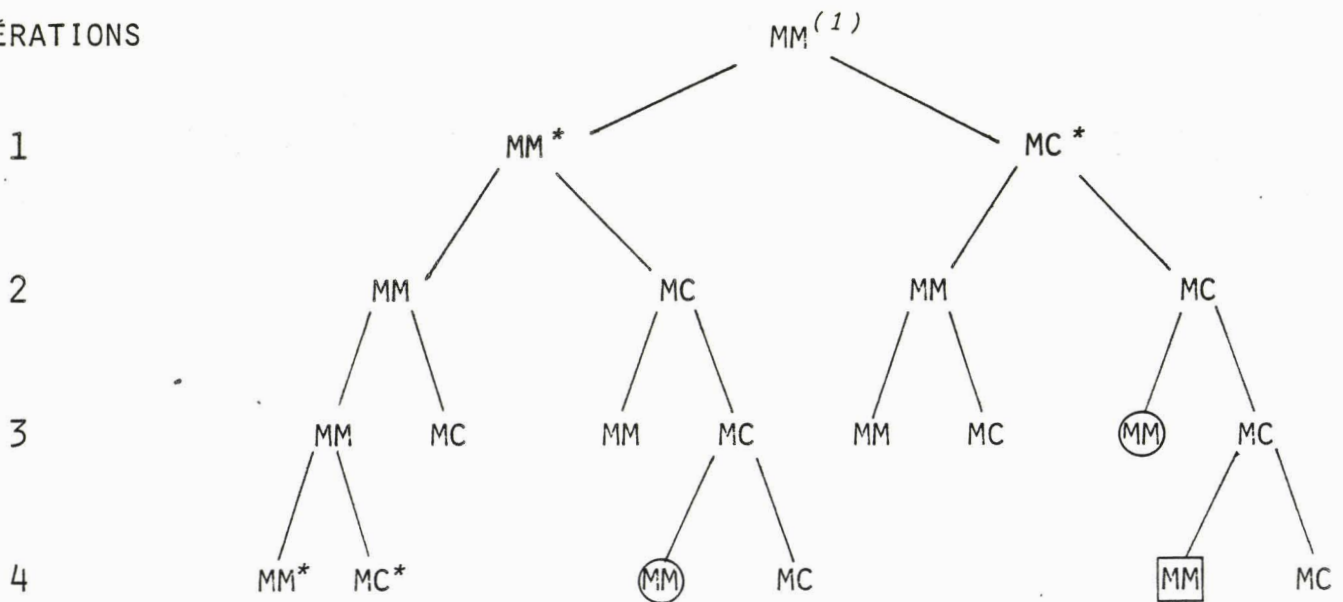
\boxed{MM} : absence de croissance sur l'ensemble des boîtes

* : génération ayant subi un clonage (voir tableau 13).



Planche 24 : CROISEMENT ADE^- (168) x LEU^- (78).

GÉNÉRATIONS



Légende :

$MM^{(1)}$: milieu minimum correspondant aux boîtes de confrontation.

\textcircled{MM} : absence de croissance sur certaines boîtes.

\boxed{MM} : absence de croissance sur l'ensemble des boîtes.

*

: génération ayant subi un clonage (voir tableau 13).



totale au troisième passage. Pour la seconde confrontation : lys^- (41) x leu^- (27), une génération supplémentaire a été nécessaire pour obtenir le même effet. On note par contre que dans les deux cas, l'entretien sur MM conduit au maintien de l'hétérocaryose.

Il apparaît clairement ici que la croissance des secteurs prototrophes résulte bien d'une mise en commun dans un même cytoplasme de noyaux génétiquement différents et incapables d'engendrer individuellement une croissance sur milieu minimum. En effet, si la complémentation s'effectuait par diffusion de métabolites d'une souche vers l'autre à travers le milieu de culture, il n'y a aucune raison pour qu'elle cesse après quelques repiquages. Par contre, dans le cas d'une croissance hétérocaryotique, si l'avantage sélectif de l'hétérocaryon disparaît par bouturage sur milieu complet, une ségrégation des deux types parentaux peut être induite et redonner alors des hyphes incapables de se développer sur MM. Le fait que cette ségrégation n'apparaisse que progressivement, indique seulement que le phénomène est aléatoire et n'intéresse pas tous les filaments hétérocaryotiques au même instant.

b) Analyse des conidies de première et quatrième générations :

Si les secteurs que nous avons isolés sont bien de nature hétérocaryotique et qu'aucun évènement de recombinaison ne s'est encore produit, nous devons retrouver dans les conidies uniquement l'un ou l'autre des deux génotypes parentaux. Mais chez *Aspergillus oryzae*, l'existence de conidies pluri-nucléées laisse prévoir, qu'avec une certaine fréquence, des spores contenant les deux noyaux en association seront produites. Ces spores seront donc capables de germer sur MM et d'engendrer des thalles eux-mêmes hétérocaryotiques.

Afin d'évaluer la fréquence des différents types nucléaires rencontrés, nous avons procédé à des isolements monospores selon la technique décrite au chapitre II et sur des échantillons de taille 100.

Les conidies apparaissent sur les hétérocaryons au bout de 8 jours. Leur forme, leur couleur et la densité de la sporulation sont équivalentes à celles de la souche sauvage. D'autre part, des mesures ont montré que leur viabilité était elle aussi du même ordre (environ 95 %). Elles sont alors récoltées dans de l'eau stérile, diluées et soumises à une prégermination de 12 heures sur milieu complet. Elles sont ensuite prélevées une à une et repiquées sur le même milieu. Au bout de 48 heures d'incubation, elles forment

SUS
LILLE

Tableau 13 : Analyse par clonage, du phénotype de 100 spores issues de différentes générations asexuelles.

- Croisement lys^- (41) x leu^- (27)

phénotypes génération (1)	+(hétérocaryotique)	leu^-	lys^-
MM_1 (2)	2	75	4
MM_4 (2)	2	80	16
MC_1	6	36	53
MC_4	17	54	28

χ^2 entre MM_1 et MM_4 = 3,65 < au seuil de 5 % pour 3 ddl.
 MC_1 et MC_4 = 17,4 > au seuil de 5 % pour 5 ddl.

- Croisement ade^- (168) x leu^- (78)

phénotypes génération (1)	+(hétérocaryotique)	ade^-	leu^-
MM_1 (2)	5	82	13
MM_4 (2)	3	78	19
MC_1	18	45	37
MC_4	9	62	28

χ^2 entre MM_1 et MM_4 = 1,35 < au seuil de 5 % pour 3 ddl.
 MC_1 et MC_4 = 7,72 < au seuil de 5 % pour 5 ddl.

- (1) l'analyse a porté sur les générations marquées d'un * sur les planches 23 et 24.
 (2) l'effectif de certaines classes étant <5 le test χ^2 ne peut pas s'appliquer. Aussi les classes hétérocaryotiques ont-elles été regroupées dans les classes parentales et le χ^2 effectué sur ces seules classes.

des thalles d'environ 20 mm de diamètre qui sont transférés par bouturage sur milieu minimum et sur milieu minimum supplémenté avec l'un ou l'autre des facteurs de croissance requis.

Après incubation, on note la croissance de chacun des clones sur ces différents milieux.

- *Résultats expérimentaux* : Les clonages ont été réalisés pour les deux croisements à partir de conidies de première et quatrième générations, isolées soit de boîtes MM soit de boîtes MC selon le schéma figuré sur les planches 23 et 24. Le but de cette expérimentation était non seulement de montrer la nature hétérocaryotique des secteurs, mais aussi de voir si la ségrégation des marqueurs dans les conidies était stable d'une génération à l'autre et si d'autre part elle était influencée par le milieu de culture. L'ensemble des résultats est consigné dans le tableau 13.

4) DISCUSSION

A la vue de ces résultats, plusieurs constatations s'imposent. Tout d'abord pour les deux confrontations, les hétérocaryons se développant sur milieu minimum engendrent un faible pourcentage de spores prototrophes qui n'excède pas 5 % pour chacun des clonages réalisés. Ces résultats sont en accord avec ceux de THORBEC et EPLOV (1974) qui montrent que pour différentes combinaisons, ce pourcentage varie de 1 à 5 %. Par contre, ISHITANI et SAKAGUCHI (1956a) obtiennent des fréquences plus élevées, de l'ordre de 15 à 20 %. Deux phénomènes sont sans doute à la base de cette différence. D'une part, les souches utilisées par ISHITANI et SAKAGUCHI possèdent un nombre moyen de noyaux par conidie supérieur au nôtre (environ 4,5 noyaux/conidie) qui peut favoriser l'établissement d'un stade hétérocaryotique. D'autre part, les marqueurs génétiques introduits par ces auteurs se distribuent de façon plus homogène dans les conidies puisque chacun des deux génotypes parentaux forme environ la moitié de l'échantillonnage. En cela, les résultats de THORBEC et EPLOV sont plus proches des nôtres puisqu'un fort déséquilibre apparaît dans la plupart des combinaisons étudiées, certains génotypes parentaux représentant 90 % de l'effectif.

Il semble donc qu'une corrélation existe entre la fréquence des spores hétérocaryotiques et celles des spores parentales, cette fréquence étant

d'autant plus faible que l'un des marqueurs est avantagé. Ceci peut être attesté en comparant l'effectif des différentes classes à partir d'hétérocaryons s'étant développés sur milieu minimum ou sur milieu complet. Dans ce dernier cas, on note que l'augmentation des spores hétérocaryotiques s'accompagne d'un rééquilibrage entre les marqueurs parentaux. Tout se passe comme si, sur MC, aucun des deux types nucléaires n'était avantagé, les conduisant à se propager au même rythme dans les filaments, alors que sur MM, le niveau de complémentation nécessaire à la croissance avantagerait un type au détriment de l'autre. Il faut toutefois se garder d'émettre des conclusions hâtives sur la nécessité d'un rapport optimum entre les noyaux mutants, dans le maintien de l'hétérocaryose. Les travaux de BEADLE et CONRADT (1944) puis ceux d'ATWOOD et PITTINGER (1955) sur *Neurospora crassa*, ont en effet montré que des hétérocaryons formés à partir de mêmes souches mutantes, donnaient naissance à des ségrégations diverses. Pour ces auteurs, l'hétérocaryose peut être maintenue dans la cellule par différents rapports nucléaires, dans la limite où le parent ayant la plus faible fréquence assure encore la complémentation. De plus, ils n'enregistrent aucune variation laissant supposer qu'un ajustement de ces fréquences s'effectue vers un rapport permettant une croissance optimale.

On peut rapprocher cette dernière observation des résultats que nous avons obtenus au bout de 4 générations asexuelles sur MM. L'identité des distributions rencontrées pour les deux croisements, entre la première et la quatrième génération, est en faveur du maintien à un niveau déterminé du rapport nucléaire. Sur MC par contre, la pression sélective disparaissant, on obtient des ségrégations qu'il n'est plus possible de regrouper statistiquement.

Il nous restait à montrer que les spores prototrophes issues des isollements monosporés de première génération, possédaient bien les deux types nucléaires en hétérocaryose et que ce stade n'était pas encore dépassé. Pour cela, nous avons laissé se développer ces colonies sur milieu minimum, puis après sporulation, des dilutions et des étalements sur MM et MC ont été réalisés. Pour deux d'entre elles, correspondant chacune à un croisement, un clonage de 100 spores a été effectué et leurs génotypes identifiés selon la méthode habituelle.

Tous les clones testés ont présenté la même réponse, à savoir, une densité de colonies toujours plus faible sur milieu minimum que sur milieu complet, représentant 5 à 20 % du total des colonies. Le résultat des clonages

est là aussi significatif puisque seules des spores parentales et hétérocaryotiques sont retrouvées (tableau 14).

Tableau 14 : Clonage de 100 spores issues de colonies prototrophes isolées à la suite des premiers clonages et correspondant aux générations MM_1 des deux croisements.

- Croisement lys^- (41) x leu^- (27)

<i>Phénotypes</i>	<i>HC</i>	<i>lys⁻</i>	<i>leu⁻</i>
<i>Effectifs</i>	2	13	85

- Croisement ade^- (168) x leu^- (78)

<i>Phénotypes</i>	<i>HC</i>	<i>ade⁻</i>	<i>leu⁻</i>
<i>Effectifs</i>	13	56	31

En résumé, les confrontations réalisées entre paires de mutants auxotrophes, engendrent des secteurs prototrophes, dont la nature hétérocaryotique a été montrée. Ces hétérocaryons sont instables et, entretenus sur milieu complet, ségrègent en redonnant naissance aux types parentaux initiaux. Sur milieu minimum par contre, la pression sélective est en faveur du maintien de l'association nucléaire et l'entretien du stade hétérocaryotique peut alors être assuré. A chaque génération asexuelle, les conidies produites par ses souches sont de trois types représentant les deux noyaux mutants seuls ou en associations, phénomène rendu possible par la présence de spores plurinucléées. Seules ces dernières sont capables de germer sur milieu minimum, engendrant à leur tour des thalles hétérocaryotiques.

A ce stade de l'analyse, aucune spore recombinée présentant un double marquage n'a pu être mise en évidence. Ceci confirme les observations d' ISHITANI et coll. puis celles de THORBEC et EPLOV, que spontanément chez cette espèce, les étapes ultérieures du cycle parasexuel ne se produisent pas, ou bien se produisent avec une fréquence trop faible pour être facilement observées.

Contrairement à d'autres espèces chez lesquelles elles se produisent naturellement, il est donc nécessaire chez *A. oryzae* d'induire ces différentes phases et en particulier la formation des noyaux diploïdes.

II. FUSIONS NUCLÉAIRES ET RECOMBINAISON À LA MITOSE

1) OBTENTION DU STADE DIPLOÏDE

L'obtention de produits recombinés, implique qu'à un moment donné les deux lots de chromosomes correspondant à chaque type nucléaire se sont trouvés réunis au sein d'un même noyau. La fréquence avec laquelle se produisent ces fusions, ainsi que la stabilité de l'état diploïde, sont très variables d'une espèce à l'autre et reflètent en somme l'efficacité du cycle parasexuel à produire des génotypes recombinés.

Chez *A. oryzae*, les travaux d'ISHITANI et coll. (1956a,b) ont montré que les diploïdes étaient très stables et ne conduisaient que faiblement à la formation de recombinés haploïdes. De plus, leur fréquence d'apparition spontanée est relativement faible, de l'ordre de 10^{-6} . Bien que ces deux facteurs constituent un handicap sérieux à l'obtention de recombinants, l'inconvénient principal réside surtout dans l'isolement du stade diploïde. En effet, la présence de spores plurinucléées pouvant abriter un stade hétérocaryotique, limite les possibilités de criblage des spores diploïdes, puisqu'elles seront toutes capables de pousser sur milieu minimum. Un tel problème ne se pose pas chez *Aspergillus nidulans*, par exemple, dont les conidies sont typiquement uninucléées. Dans ce cas, une colonie se développant sur un milieu minimum sera nécessairement diploïde.

Il s'est donc avéré nécessaire de mettre au point une méthodologie permettant d'augmenter la fréquence des diploïdes chez *A. oryzae* à un niveau tel que leur isolement soit rendu possible. Ce sont ici encore les travaux d'ISHITANI et coll. (1956a,b) puis ceux d'IKEDA et coll. (1957) qui ont permis cette mise au point. Ces auteurs ont en effet montré que le rayonnement ultra-violet appliqué à des spores hétérocaryotiques augmentait de façon considérable la fréquence des diploïdes qui pouvait représenter jusqu'à 30 % des survivants. Bien qu'aucune explication du mécanisme n'ait été fournie, ces résultats ont été confirmés plus tard par THORBEK et EPLOV (1974). Aussi avons-nous entrepris d'utiliser cette méthodologie à notre tour.

Chez *A. oryzae*, l'état diploïde étant stable, toutes les conidies engendrées à ce niveau seront diploïdes et donc prototrophes. A l'inverse, le stade hétérocaryotique conduit en permanence à une ségrégation des marqueurs parentaux. Il est donc possible de différencier ces deux états en semant les spores issues de chacun d'eux sur milieu minimum et sur milieu complet. Nous avons utilisé cette propriété comme premier critère de sélection des diploïdes.

- *Protocole expérimental* : Une suspension des spores provenant d'un croisement hétérocaryotique est réalisée dans de l'eau stérile puis filtrée sur coton de verre. Elle est soumise ensuite à une irradiation sous lumière ultra-violette pendant des durées variables. Trois expositions ont été étudiées, chacune d'elles représentant une expérience. Après des dilutions appropriées, la suspension irradiée est étalée sur MM et le taux de survie calculé après incubation en comparant le nombre de colonies développées sur MM avant et après irradiation. 20 colonies sont prélevées au hasard à partir de boîtes irradiées et transférées sur MM. Après sporulation, chacune d'elles est testée sur MM et MC. Seuls sont retenus les clones qui présentent une même densité de colonies sur ces deux milieux.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 15.

La fréquence avec laquelle nous avons obtenu des spores diploïdes est assez faible comparativement aux résultats d'ISHITANI et coll. (1956a,b) puisque 5 % seulement des survivants ont atteint ce stade après des durées variables d'irradiation. C'est sans doute pour cette raison que de nombreuses expérimentations ont été nécessaires avant d'aboutir à leur isolement. En culture sur milieu de Czapek, l'aspect des colonies diploïdes est très semblable à celui des hétérocaryons qui leur ont donné naissance. Leur croissance rapide et

leur sporulation abondante montrent que le doublement de leur contenu nucléaire ne semble pas affecter ces souches ce qui est à rapprocher des observations d'ISHITANI et coll. (1956a) concernant leur stabilité.

Cependant, le critère de sélection que nous avons employé ne permet pas à coups sûrs de dire que le stade diploïde est atteint par ces souches, puisque nous n'avons pas testé comparativement la fréquence de réversion des marqueurs génétiques introduits et que ce phénomène est toujours probable. Aussi, avons-nous utilisé un critère plus précis en nous attachant à mesurer le nombre moyen de noyaux par conidie qui, selon les travaux d'ISHITANI et coll. (1956,c), est plus faible chez les diploïdes que chez les parents haploïdes ou les hétérocaryons.

Tableau 15 : Nombre de diploïdes isolés pour 20 colonies prototrophes testées après irradiation aux U.V. de spores hétérocaryotiques.

Temps d'exposition	3 minutes		5 minutes		8 minutes	
	taux de survie	nbre de diploïdes	taux de survie	nbre de diploïdes	taux de survie	nbre de diploïdes
<i>lys⁻(41) x leu⁻(27)</i>	23 %	0	4 %	1	0,7 %	0
<i>ade⁻(168) x leu⁻(78)</i>	11 %	1	5 %	1	-	-



2) DISTRIBUTION NUCLEAIRE CHEZ LES DIPLOIDES

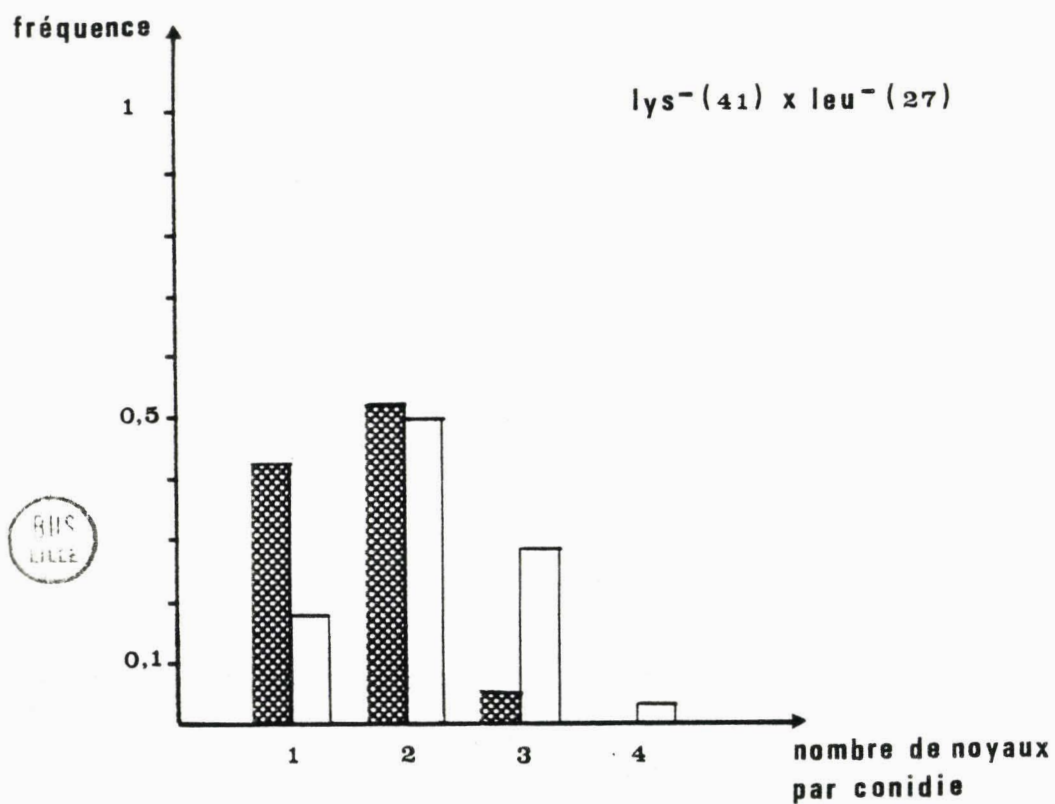
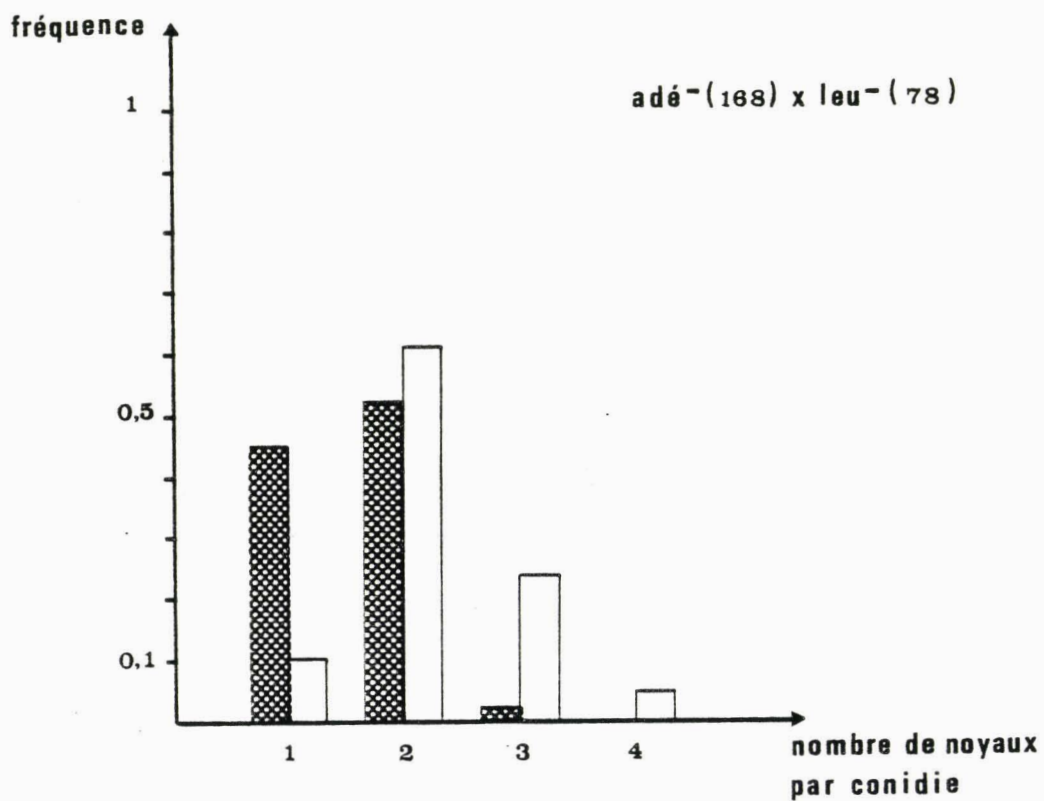
Pour de nombreuses espèces, le stade diploïde est caractérisé par une augmentation du diamètre des conidies qui devient sensiblement double de celui des haploïdes. C'est le cas en particulier pour *Aspergillus nidulans* ou *Penicillium chrysogenum* dont les conidies sont typiquement uninucléées. Par contre, chez *Aspergillus oryzae*, si leur diamètre ne change pas on assiste à une diminution du nombre moyen de noyaux par conidie. Des mesures du contenu en ADN de conidies ont été faites par ISHITANI et coll. (1956 c) qui ont clairement montré que cette quantité ne varie pas du stade haploïde au stade diploïde mais que par contre la quantité d'ADN par noyau devient double.

Les trois souches supposées diploïdes que nous avons obtenues après irradiation, ont donc été soumises à une investigation quant à leur contenu nucléaire par la technique de coloration employée au chapitre II. Le tableau 16 regroupe les valeurs mesurées à la fois pour les diploïdes et pour les hétérocaryons ayant servi à leur isolement.

Tableau 16 : Nombre moyen de noyaux par conidie issue de générations hétérocaryotiques ou diploïdes.

	Souches	Nombre moyen de noyaux/conidie
<i>ade⁻ (168) x leu⁻ (78)</i>	Hétérocaryon	2,24
	Diploïde (1) (isolé après 3 minutes d'irradiation)	1,50
	Diploïde (2) (isolé après 5 minutes d'irradiation)	1,63
<i>lys⁻ (41) x leu⁻ (27)</i>	Hétérocaryon	2,16
	Diploïde (isolé après 5 minutes d'irradiation)	1,63

Planche 25 : Distribution nucléaires dans les conidies hétérocaryotiques  et diploïdes  obtenues.



Les résultats obtenus sont tout à fait significatifs puisqu'une très nette diminution du nombre moyen de noyaux/conidie est enregistrée. Nos valeurs sont de plus très proches de celles de THORBEC et EPLOV (1974). On pourrait s'étonner cependant de ne pas retrouver chez les diploïdes un nombre plus proche de la moitié de celui des haploïdes. Toutefois, ces derniers possèdent déjà un nombre moyen de noyaux/conidie assez faible qui nécessiterait qu'au stade diploïde seules des conidies uninucléées soient produites, ce qui paraît peu compatible avec la biologie générale de cette espèce. On peut noter d'autre part, que cette variation apparaît d'autant plus significative que l'on s'intéresse à la distribution de fréquence des noyaux dans les conidies (planche 25). On constate alors qu'au stade diploïde, une augmentation très nette des conidies uninucléées est enregistrée alors que cette fréquence est toujours faible dans les hétérocaryons.

En conclusion, le stade diploïde est caractérisé d'une part par la production de conidies toutes prototrophes, phénomène rendu possible par la récessivité des marqueurs d'auxotrophie par rapport aux allèles sauvage, d'autre part, par une diminution du nombre moyen de noyaux/conidie et une augmentation importante des conidies uninucléées. Puisque désormais, les deux lots de chromosomes sont réunis dans un unique noyau, il devient possible d'aborder la dernière étape du cycle parasexuel : la production de recombines haploïdes.

3) OBTENTION DE CLONES RECOMBINES

Chez *A. oryzae*, la stabilité de l'état diploïde semble conduire spontanément à peu de recombinaisons. Les résultats d'ISHITANI et coll. (1956,b) indiquent que cette fréquence est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} . Il apparaît donc nécessaire ici encore, d'induire cette dernière étape du cycle parasexuel.

Les travaux de LHOAS (1961) et de HASTIE (1970) ont montré à cet égard que deux substances, la parafluoro-phénylalanine et le bénomyl, avaient pour effet d'augmenter très fortement la fréquence des recombines haploïdes chez *Aspergillus niger* et *Aspergillus nidulans*. Il semble que ces deux produits agissent directement sur la β -tubuline du fuseau mitotique, créant ainsi des modifications au niveau des microtubules (MORRIS et OAKLEY, 1979). Ces modifications entraînent un fonctionnement anormal du fuseau au cours de la mitose qui permet la perte aléatoire de certains chromosomes et le retour à l'état

haploïde par différents stades aneuploïdes. D'après LHOAS, les résultats obtenus avec la p-fluorophénylalanine sont tout à fait comparables à ceux trouvés par KÄFER (1961) dans son étude sur la ségrégation spontanée de diploïdes chez *Aspergillus nidulans*.

L'efficacité de ces composés à produire des génotypes recombinés, a depuis été montrée chez d'autres espèces, en particulier *Aspergillus amstelodami* (De BERTOLDI et CATEN, 1979), ainsi que chez *Aspergillus oryzae* (THORBEC et EPLOV, 1974). Aussi, avons-nous entrepris d'obtenir de tels clones par cette voie. Seule la p-fluorophénylalanine a été utilisée comme agent haploïdisant de par sa commodité d'emploi puisque, contrairement au bénomyl, c'est un produit soluble dans l'eau qui permet une incorporation homogène dans le milieu de culture.

a) Protocole expérimental :

Une suspension de spores issues d'une souche diploïde est étalée sur milieu complet et milieu complet contenant de la parafluorophénylalanine à raison d'environ 50 colonies par boîte. Après une incubation de 14 jours, les colonies ont sporulé sur pFPA et les spores sont récoltées, soumises à une prégermination sur milieu complet et clonées sur ce même milieu. Leur génotype est ensuite déterminé par bouturage sur milieu minimum et milieu minimum contenant les facteurs de croissance nécessaires seuls ou en association.

b) Résultats expérimentaux :

Quatre concentrations en pFPA ont été testées, à savoir : 20-50-100-150 µg/ml. Aucune croissance n'est apparue sur les boîtes contenant 100 et 150 µg/ml de pFPA, par contre à 20 et 50 µg/ml la viabilité n'est pas réduite par rapport aux témoins sans pFPA mais on constate une réduction très importante de la croissance des colonies et de leur sporulation. Afin de nous situer dans les conditions qui semblaient les plus propices, nous avons effectué les clonages à partir de boîtes de Pétri contenant 50 µg/ml de pFPA. Deux souches diploïdes correspondant chacune à un croisement ont subi une haploïdisation. Pour chacune d'elles, le génotype d'environ 200 spores a été déterminé. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Phénotypes obtenus après action de la p-fluorophénylalanine sur des souches diploïdes.

- Croisement lys^- (41) x leu^- (27)

Phénotypes	+	lys^-	leu^-	$lys^-.leu^-$
Effectifs	191	7	3	3

- Croisement ade^- (168) x leu^- (78)

Phénotypes	+	ade^-	leu^-	$ade^-.leu^-$
Effectifs	203	13	8	1

Nous avons pu remarquer que l'aspect des clones isolés après haploïdisation est assez différent de celui de la souche diploïde qui est à leur origine. Pour la plupart, la conidiogénèse est retardée et lorsqu'elle se produit, elle est engendrée par des conidiophores beaucoup plus courts qui confèrent aux colonies un aspect très ras. De plus, pour certains d'entre eux, une croissance et une sporulation sectorielles apparaissent. Un phénotype particulier n'est pas impliqué dans ce phénomène qui a touché aussi bien des clones demeurés prototrophes que des clones mutants.

Nous avons d'autre part envisagé de voir si le stade haploïde était retrouvé pour certains clones, par l'analyse de leur nombre moyen de noyaux par conidie. Seuls les doubles mutants ont fait l'objet de cette étude car leur probabilité d'être revenu au stade haploïde était plus grande étant donné la récessivité des marqueurs d'auxotrophie. Les résultats obtenus pour ces 4 clones sont consignés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Nombre moyen de noyaux/conidie pour quelques souches recombinées.

Souche	Nombre moyen de noyaux par conidie
13 (<i>lys⁻.leu⁻</i>)	2,26
14 (<i>lys⁻.leu⁻</i>)	2,33
134 (<i>lys⁻.leu⁻</i>)	2,24
112 (<i>ade⁻.leu⁻</i>)	2,40

4) DISCUSSION

La parafluorophénylalanine induit la formation de noyaux recombinés chez *A. oryzae* puisqu'à partir d'une population diploïde entièrement prototrophe, on retrouve en fin d'expérience des clones à nouveaux mutants. La fréquence avec laquelle se produisent les recombinaisons peut paraître faible au premier abord, mais il convient de faire plusieurs remarques. Tout d'abord, l'utilisation d'un simple marquage sur nos souches ne permet de reconnaître au maximum que 4 classes de recombinés, des recombinés simples mutants contenant l'un ou l'autre des marqueurs introduits, des doubles mutants possédant les deux marqueurs en association et des recombinés prototrophes ayant éliminé au cours de l'haploïdisation les chromosomes porteurs de mutations. Toutefois, cette dernière classe est très difficile à mettre en évidence car d'autres phénomènes peuvent intervenir. En effet, il n'est pas exclu que parmi les clones prototrophes une proportion importante ne soit pas revenue au stade haploïde initial mais possède une garniture chromosomique aneuploïde. A cet égard, les travaux de KÄFER (1961) ont montré que chez *A. nidulans* la majorité des ségrégants obtenus est de ce type. Généralement, cette classe de noyaux est instable et continue à ségréger jusqu'à ce que le stade haploïde soit atteint.

Pour notre part, nous n'avons pas entrepris d'étudier plus en détail cette possibilité étant donné le faible marquage que nous avons sur les

souches, mais il n'est pas impossible que nombre de clones isolés puissent être regroupés dans cette classe.

C O N C L U S I O N

L'étude que nous avons entreprise sur le cycle parasexuel d'*Aspergillus oryzae* nous a permis d'obtenir des lignées recombinées pour certains caractères marqueurs que nous avons introduits par mutagenèse. Le choix de ces marqueurs a été guidé par la nécessité d'altérer le moins possible la physiologie de nos souches et en particulier la production d' α -amylase. Nous avons cependant remarqué que parmi les clones auxotrophes isolés, nombre d'entre eux étaient inaptes à toute investigation de par leur faible croissance ou leur conidiogénèse pauvre sur milieu complet.

Les clones mutants qui ont retenu notre attention nous ont permis de réaliser des confrontations de thalles dans le but d'initier la première étape du cycle parasexuel, l'hétérocaryose. D'emblée nous avons rencontré un problème sérieux en confrontant deux à deux des mutants issus de la souche BrBv IV ou bien lors de croisements faisant intervenir des mutants de chacune des souches. Dans ces conditions, aucun secteur prototrophe n'a pu être décelé montrant que la voie des anastomoses naturelles semble interdite chez la souche BrBv IV. A l'inverse, de nombreuses confrontations entre mutants de la souche 1135 ont donné naissance à des secteurs prototrophes dont la nature hétérocaryotique a pu être montrée. A cet égard, deux points ont principalement été étudiés. D'une part, nous avons vérifié que le maintien de l'hétérocaryose est fortement conditionné par le milieu de culture, puisque sur milieu complet l'hétérocaryon perd son avantage sélectif au profit d'homocaryons mutants. Cette ségrégation n'est pas immédiate, car plusieurs transferts semblent nécessaires à son apparition. D'autre part, nos résultats ont confirmé l'existence de trois types de conidies au stade hétérocaryotique, correspondant à l'un ou l'autre des marqueurs parentaux ou à leur coexistence au sein d'une même spore, phénomène rendu possible par leur état plurinucléé.

La fréquence de ces spores hétérocaryotiques est un handicap sérieux à l'isolement de diploïdes qui, phénotypiquement, ne sont pas dissociables. L'irradiation aux rayons ultra-violets lève partiellement cette difficulté en augmentant la fréquence des diploïdes jusqu'à un niveau compatible avec l'expérimentation, mais elle peut permettre de la même manière, l'apparition de mutations nouvelles dont la reconnaissance peut être délicate. Nous avons pu observer qu'au stade diploïde la distribution des noyaux dans les spores était tout à fait particulière puisqu'on enregistrait à la fois une diminution du nombre moyen de noyaux/conidie et une augmentation importante des conidies uninucléées qui peuvent représenter jusqu'à 50 % de l'effectif.

L'haploïdisation de ces souches par la parafluorophénylalanine conduit semble-t-il à un retour plus ou moins complet à l'état haploïde qui s'accompagne de recombinaisons pour les marqueurs parentaux, puisque des clones possédant les deux auxotrophies ont été isolés. L'analyse de la distribution nucléaire de leurs conidies montre qu'elles ne sont pas demeurées diploïdes, mais que probablement l'état haploïde est retrouvé pour celles qui ont été testées.

Il apparaît donc que le cycle parasexuel d'*A. oryzae* répond au schéma général proposé par PONTECORVO (1956) mais présente un certain nombre de difficultés dans sa réalisation dues au fait que la sélection des diploïdes n'est pas immédiate et que, de plus, cet état fait preuve d'une grande stabilité. Au contraire, chez une espèce comme *Pyricularia oryzae*, dès lors que l'hétérocaryose a été initiée par confrontation de thalles mutants, il suffit de récolter les conidies émises par les secteurs prototrophes au bout d'environ 25 jours pour obtenir des clones recombinés, les différentes étapes du cycle se produisant sans l'intervention de l'expérimentateur (MAKOUNZI, 1978). Sans doute, la grande variabilité qui existe dans les modalités d'exécution de ces différents cycles, reflète-t-elle l'importance réelle qu'ils occupent dans la nature. Il n'est pas impossible que chez *A. oryzae* son efficacité à produire de nouvelles combinaisons soit faible et qu'il n'intervienne que de façon minime dans l'évolution et la dynamique des populations naturelles.

En conclusion, dans cette partie de notre travail, nous avons mis au point les techniques nécessaires à l'accomplissement du cycle parasexuel d'*Aspergillus oryzae* afin d'obtenir des génotypes nouveaux résultant de recombinaisons. Malgré tout, l'intérêt de notre expérimentation demeure faible dès lors que seules des recombinants issus d'une souche unique ont été isolés,

alors que nous nous sommes proposé d'étudier les possibilités de recombinaison du caractère "production d' α -amylase", entre nos deux souches. Les nombreux tentatives que nous avons faites dans le but de forcer l'hétérocaryose sont restées des échecs reflétant par là l'impossibilité de la souche BrBv IV à s'anastomoser. Le développement récent des techniques de fusion de protoplastes chez les Champignons inférieurs nous a encouragé à chercher dans cette voie la solution à notre problème. En effet, si seule la paroi mycélienne est impliquée dans le phénomène, empêchant les anastomoses de se réaliser, son élimination au niveau des protoplastes peut permettre l'établissement de l'hétérocaryose. Nous avons donc envisagé de recourir à cette méthodologie afin d'obtenir les clones nécessaires à notre étude.

CHAPITRE II :

FUSION DE PROTOPLASTES.

INTRODUCTION

A l'instar des travaux réalisés chez les végétaux supérieurs, des techniques de fusion de protoplastes ont été développées depuis quelques années sur des microorganismes fongiques, dans le but d'établir de nouvelles associations génétiques, principalement entre espèces différentes (KEVEI et PEBERDY, 1977-1979). Les résultats présentés par diverses équipes de chercheurs, montrent que des produits hybrides viables peuvent être isolés par cette voie, là où les anastomoses naturelles sont inefficaces.

L'intérêt croissant que semblent prendre ces techniques tant sur le plan de la génétique fondamentale que sur celui de l'amélioration des microorganismes industriels, a permis la mise au point d'une méthodologie de base, assez largement utilisée à l'heure actuelle (PEBERDY, 1980). Aussi est-ce à partir de ce schéma général que nous avons entrepris d'obtenir des produits de fusion entre la souche BrBv IV et la souche 1135.

I. LES CONDITIONS AFFECTANT LA FUSION : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La réalisation de fusions nécessite en tout premier lieu, qu'un contact étroit s'établisse entre les membranes de deux ou plusieurs protoplastes.

Ce contact n'est généralement pas réalisé dans les solutions hypertoniques employées usuellement pour leur stabilisation (KCl - NaCl - Mannitol) bien que FERENCZY et coll. (1975 a) en particulier, aient obtenu des fusions dans un système salin au KCl 0,6 M tamponné à pH 6 par un tampon citrate-phosphate. Il reste cependant que la fréquence de ces fusions demeure faible et rend compte du peu d'aptitude qu'ont les protoplastes à former des agrégats dans ces conditions. Afin d'augmenter la coalescence membranaire, l'emploi d'un agent de fusion, le polyéthylène glycol (PEG) s'est généralisé. Il permet, dès sa mise en contact des protoplastes, la formation d'agrégats de tailles variées comprenant le plus souvent entre 5 et une vingtaine d'individus et assure leur cohésion. Ce phénomène se produit spontanément dans des solutions ne contenant que du PEG dès que sa concentration développe une pression osmotique suffisante au maintien de la structure des protoplastes.

1) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN PEG SUR LA FREQUENCE DE FUSION

Sous ses deux masses moléculaires les plus employées, 4000 et 6000, la stabilisation des protoplastes est assurée pour des concentrations en PEG supérieures ou égales à 20 %. Au-delà de 40 %, l'augmentation importante de la pression osmotique de la solution entraîne des modifications dans la structure des protoplastes qui perdent leur aspect turgescent et se déforment. Cependant, une dilution ultérieure du milieu leur permet de regagner leur forme initial.

L'adjonction de PEG à une suspension de protoplastes n'est pas sans effet sur leur viabilité. ANNE et PEBERDY (1976) montrent que seuls 10 % des protoplastes survivent à un traitement de 10 minutes à 30°C dans une solution contenant 30 % de PEG (PM 6000). Ces mêmes auteurs (1975) notent cependant qu'une augmentation de la concentration, jusqu'à 60 %, ou de la durée d'incubation, jusqu'à 1 heure, si elles s'accompagnent d'une réduction encore plus importante de la viabilité, n'affectent pas significativement la fréquence de fusion. Pour ces auteurs, cette fréquence augmente rapidement durant les premières minutes

d'incubation pour se stabiliser au bout d'environ 10 à 15 minutes. Ce laps de temps semble nécessaire à un enrobage complet des protoplastes par le PEG et à l'adhésion des surfaces membranaires. En général, une concentration en PEG de l'ordre de 30 à 40 % semble optimale, en assurant à la fois la stabilité des protoplastes et en affectant le moins possible leur viabilité.

2) INFLUENCE DU pH ET DE LA CONCENTRATION EN IONS Ca^{++} SUR LA FREQUENCE DE FUSION

En dépit d'une bonne aggrégation des protoplastes en présence de PEG, la fréquence de fusion demeure faible lorsqu'il est utilisé seul. Il semble que la cohésion des membranes ne soit pas alors suffisamment forte pour conduire à leur rupture et à la formation de produits de fusions. Dans ces conditions, la valeur du pH du milieu apparaît comme étant critique. ANNE et PEBERDY (1975) montrent en effet qu'à pH 7,5 la fréquence de fusion est 10 fois supérieure à celle obtenue à pH 9, pour une solution contenant 30 % de PEG. Pour ces auteurs, le PEG se lierait aux membranes plasmiques par l'intermédiaire de ponts hydrogènes qui s'établiraient d'autant plus facilement que le pH serait plus faible. Le type de liaison existant entre la membrane et le PEG apparaît donc comme étant assez labile et pour cette raison, des études ont été menées dans le but d'augmenter la force des liaisons. A cet égard, les travaux de CONSTABEL et KAO (1974) ont démontré l'importance de l'ion Ca^{++} dans le processus de fusion chez les végétaux supérieurs, importance qui a été confirmée sur les protoplastes fongiques.

A des concentrations de l'ordre de 10 mM de $CaCl_2$, l'action du PEG est déjà considérablement renforcée (FERENCZY et coll., 1975b), mais elle apparaît optimale, aux alentours de 100 mM de $CaCl_2$ (PEBERDY, 1980). Ici encore le rôle du pH est déterminant. Cependant, à l'inverse des solutions dépourvues de calcium, la présence de cet élément nécessite un pH plus élevé. Pour ANNE et PEBERDY (1975), une solution de PEG à 30 % contenant 50 mM de $CaCl_2$ engendre trois fois plus de fusions à pH 9 qu'à pH 7,5. L'influence du pH est encore plus significative pour les fortes concentrations en ions Ca^{++} puisqu'à 600 mM $CaCl_2$, 30 fois plus de fusions sont observées à pH 9. Les raisons pour lesquelles des conditions alcalines sont requises en présence de calcium ne sont pas encore très clairement établies, par contre il semble admis que cet ion puisse se fixer sur la membrane plasmique et assurer un pont moléculaire entre cette

dernière et les molécules de PEG. Cette interprétation est supportée par le fait que les ions Na^+ et K^+ réduisent l'effet de calcium par une fixation préférentielle sur la membrane (PEBERDY, 1980).

3) LES AUTRES PARAMETRES

Sans jouer un rôle de facteurs limitants, certaines conditions expérimentales agissent de façon sensible sur la fréquence de fusion. Il s'agit en particulier de la température et du laps de temps qui sépare l'isolement des protoplastes et leur fusion.

Pour ANNE et PEBERDY (1975) la fréquence de fusion augmente régulièrement avec la température entre 4° et $37,5^\circ\text{C}$ grâce à une baisse de viscosité du PEG, qui assure alors un contact plus étroit entre les protoplastes. Mais corrélativement, leur viabilité diminue et à $37,5^\circ\text{C}$ elle chute de façon dramatique. Une température comprise entre 20°C et 30°C semble toutefois être optimale.

Ces mêmes auteurs ont étudié l'effet, sur la fusion, du maintien des protoplastes soit dans le complexe lytique ayant servi à leur isolement, soit dans une solution hypertonique de NaCl et ceci pendant des durées variables. Ils remarquent que dans ces deux systèmes, les protoplastes présentent un accroissement important de leur volume cellulaire qui ne s'accompagne pas de la régénération d'une paroi. Dans ces conditions, l'augmentation de la surface membranaire qui en résulte conduit à favoriser les contacts entre protoplastes et assure une fréquence de fusion supérieure. Passé 20 heures pour le système salin au NaCl et 40 heures pour le complexe lytique, la létalité devient cependant très importante et réduit d'autant le nombre de produits hybrides obtenus.

En conclusion, trois paramètres semblent intervenir de façon déterminante lors du processus de fusion ; la concentration en PEG, la présence d'ions Ca^{++} et le pH. Pour ces deux derniers paramètres, une relation a pu être mise en évidence puisqu'un pH élevé est nécessaire en présence de calcium, condition défavorable lorsque cet élément n'est pas ajouté au milieu de fusion. En conséquence, nous avons entrepris de suivre l'influence de ces trois facteurs sur la fusion de notre matériel.

II. ETUDE EXPERIMENTALE

1) PROTOCOLE GENERAL

Pour cette étude, nous avons réalisé plusieurs séries d'expériences dont certaines conditions ont été modifiées en fonction des résultats obtenus pour les précédentes, aussi nous a-t-il semblé préférable de les reprendre ici dans leur ordre chronologique. La procédure générale que nous avons retenue a été la suivante.

Après leur obtention dans les conditions décrites au chapitre III, les protoplastes sont filtrés sur verre fritté (porosité 1), centrifugés, lavés deux fois avec une solution de NaCl 0,7 M puis repris dans la même solution. Les protoplastes de chaque mutant sont alors réunis en tube corex à raison d'environ 10^6 protoplastes par mutant, à nouveau centrifugés puis remis en suspension dans 1 ml d'une solution de PEG préalablement portée à 30°C. L'incubation se fait à cette même température pendant 15 minutes. Le PEG est alors dilué par 5 ml de milieu minimum hypertonique (0,6 M NaCl) puis après centrifugation et lavage, le culot est remis en suspension dans une solution de NaCl 0,7 M à raison de 4 ml par tube. Une partie de cette suspension nous a servi à évaluer le taux de survie après dilution et étalement sur milieu complet quant au reste (environ 5×10^4 protoplastes), il était étalé à forte densité sur milieu minimum afin de rechercher les produits de fusion. Des protoplastes non traités au PEG mais ayant subi le même protocole nous ont servi de témoins.

2) UTILISATION D'UNE SOLUTION FUSIOGENE TYPE

Pour cette expérimentation, nous avons utilisé une solution de PEG (PM = 6000) à 30 % contenant 0,01 % CaCl_2 + 0,05 M glycine ajustée à pH 7,5 par NaOH 0,01 N, cette solution ayant donné de bons résultats chez diverses espèces de *Penicillium* et d'*Aspergillus* (ANNE et PEBERDY, 1975-1976 ; FERENCZY et coll., 1975b). Les mutants employés appartenait chacun à une souche différente, à savoir :

- pour la souche BrBv IV : 132 (*leu*⁻)
- pour la souche 1135 : 168 (*ade*⁻).

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 19.

Tableau 19 : densité des suspensions initiales avec ou sans traitement au PEG et nombre de clones développés sur MM pour environ 5×10^4 protoplastes.

Traitement	Densité sur MC	Nbre de clones sur MM pour environ 5×10^4 protoplastes	Taux de survie
132 (<i>leu</i> ⁻) sans PEG	3×10^6	0	100 %
168 (<i>ade</i> ⁻) sans PEG	$2,2 \times 10^6$	0	100 %
132 + 168 sans PEG	$4,7 \times 10^6$	0	100 %
132 + 168 avec PEG	$8,5 \times 10^4$	0	1,8 %

Comme on peut le constater, une réduction importante de la viabilité des protoplastes se produit en présence de PEG puisque seuls 1,8 % survivent au traitement. L'observation microscopique nous a montré que cette perte de viabilité était due à l'éclatement des protoplastes dans la solution de PEG car de nombreux débris cytoplasmiques apparaissaient dans les préparations. Néanmoins, il était difficile de dire si cet éclatement provenait d'un effet lytique du PEG sur la membrane ou d'une pression osmotique insuffisante. Il reste cependant qu'aucun produit de fusion n'est apparu pour 5×10^4 protoplastes étalés sur MM alors que ANNE et PEBERDY (1976) obtiennent dans les mêmes conditions des fréquences de fusion d'environ 1 à 7 % pour des viabilités de l'ordre de 10 %.

A la suite de cette expérimentation, nous nous sommes demandé si la forte létalité que nous avons enregistrée, n'était pas la cause principale de notre échec. Puisque la concentration en PEG joue un rôle important dans le maintien ou non de la structure des protoplastes, nous avons envisagé de faire l'étude d'une gamme de concentration de ce produit fusio-gène.

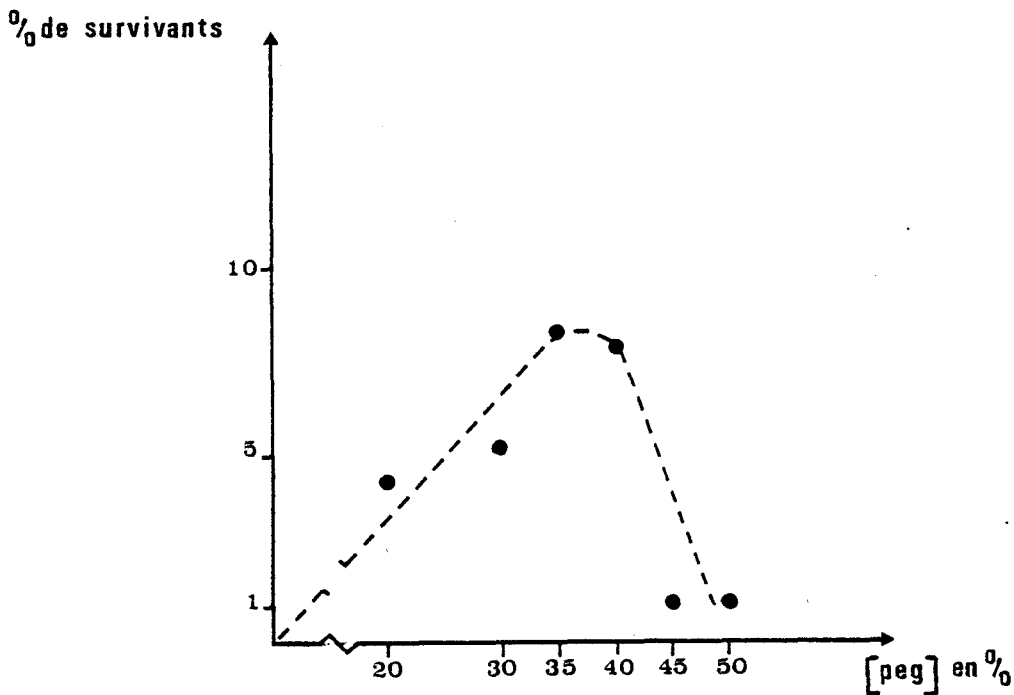
3) ETUDE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN PEG

Ici, seule la concentration en PEG a varié, les concentrations en CaCl_2 et glycine ainsi que le pH étant identiques à ceux de la première série. Ont été testées 6 concentrations en PEG : 20-30-40-45-50 %, le protocole expérimental demeurant inchangé ainsi que les mutants employés pour l'expérimentation.

- *Discussion* : L'observation de la planche 26 nous montre qu'à une concentration de 35 % la létalité est la moins forte puisque 10 % des protoplastes survivent. Cependant, nous n'obtenons pas les mêmes résultats que précédemment concernant la concentration 30 % puisqu'ici environ 6 % des protoplastes sont encore viables.

Passé 40 %, la létalité devient toutefois très importante et sous le microscope l'aspect des protoplastes est considérablement modifié, indiquant une trop forte pression osmotique.

Planche 26 : Pourcentage de protoplastes survivants après action de différentes concentrations en PEG pendant 15 minutes.



En dépit d'une viabilité meilleure, les résultats obtenus sur milieu minimum ont été les mêmes que précédemment, aucun clone prototrophe n'ayant été isolé. Dans ces conditions, plusieurs hypothèses pouvaient être émises. Tout d'abord, le choix des mutants étant arbitraire, on pourrait envisager que leur complémentarité ne soit génétiquement pas possible et conduise à des produits de fusions non viables, dans ce cas l'utilisation d'autres souches mutantes devrait permettre l'isolement de clones prototrophes. Par ailleurs, l'état initial des protoplastes pouvait jouer un rôle sur leur aptitude à fusionner. Nous avons pu remarquer en effet que dans nos conditions d'expériences, de rares agrégats se formaient quelle que soit la concentration en PEG utilisée. Il était possible alors que leur maintien dans le complexe lytique pendant une certaine période, favorise leur aggrégation en augmentant les surfaces membranaires comme ont pu le montrer ANNE et PEBERDY (1975). Aussi avons-nous envisagé d'étudier ces deux paramètres.

4) INFLUENCE DE LA CONSERVATION DES PROTOPLASTES SUR LEUR FUSION

Au lieu de subir l'étape de fusion juste après leur isolement, les protoplastes ont été conservés 20 heures à +4°C dans le complexe lytique. Pour cette expérimentation, deux mutants de la souche 1135 ont été employés : les mutants 168 (ade^-) et 78 (leu^-) pour lesquels nous savions qu'aucune barrière n'existait à leur complémentarité puisque, par anastomoses naturelles, ils avaient engendré des hétérocaryons tout à fait viables.

Afin de favoriser la fusion, nous avons utilisé ici une solution de PEG à 35 % qui, d'après les premiers résultats semblait stabiliser le mieux les protoplastes en affectant le moins possible leur viabilité.

- *Discussion* : La conservation des protoplastes dans le complexe lytique s'est traduite par une perte de viabilité d'environ 30 % mais aussi par une augmentation importante du volume cellulaire qui a permis d'observer, en présence de PEG, la formation de nombreux agrégats. Le plus souvent, ils étaient constitués de 5 à 10 protoplastes très turgescents malgré la concentration en PEG et fortement accolés les uns aux autres. Après dilution par du milieu minimum hypertonique et lavage dans NaCl 0,7 M, pratiquement tous les agrégats avaient disparu ne laissant qu'une population de protoplastes isolés. Nous n'avons pas

remarqué cependant une augmentation de taille pour certains protoplastes consécutive à la fusion comme le signalent plusieurs auteurs, toutefois, comme l'indique le tableau 20, le nombre faible de clones prototrophes isolés après étalement sur milieu minimum, laisse penser que leur observation était difficile. Malgré tout, il est probable que les 3 clones isolés soient bien le produit de fusions de protoplastes et non d'anastomoses qui auraient pu se produire au cours de la régénération sur boîtes, car la suspension témoin, traitée dans les mêmes conditions, n'a donné naissance à aucun produit prototrophe.

Tableau 20 : Densité des suspensions initiales avec ou sans traitement au PEG et nombre de clones développés sur MM pour environ 5×10^4 protoplastes.

<i>Traitement</i>	<i>Densité sur MC</i>	<i>Nbre de clones sur MM pour environ 5×10^4 protoplastes</i>	<i>Taux de survivants en %</i>
<i>168 (ade⁻) sans PEG</i>	$8,5 \times 10^5$	0	100 %
<i>78 (leu⁻) sans PEG</i>	7×10^5	0	100 %
<i>168 + 78 sans PEG</i>	2×10^6	0	100 %
<i>168 + 78 avec PEG</i>	3×10^5	3	15 %

La conservation des protoplastes dans le complex lytique, semble donc favoriser la formation d'aggrégats, étape primordiale dans la fusion, en augmentant les surfaces membranaires disponibles. La fréquence de fusion reste cependant très faible, $3/5 \times 10^4 = 0,006 \%$, bien que les mutants soient issus d'une unique souche et ne présentent aucune difficulté à se compléter. Toutefois, ce premier résultat nous a encouragé à suivre la même méthodologie avec, cette fois-ci, des mutants issus des deux souches.

5) ESSAIS DE FUSION SUR DIFFERENTS CROISEMENTS

Nous avons utilisé dans cette expérimentation à la fois les deux mutants précédents, soit le 168 (*ade*⁻) et le 78 (*leu*⁻) provenant de la souche 1135 ainsi que le mutant 381 (*arg*⁻) issu de la souche BrBv IV. De cette façon, nous avons pu réaliser les trois croisements suivants :

- 168 (*ade*⁻) x 78 (*leu*⁻)
- 78 (*leu*⁻) x 381 (*arg*⁻)
- 381 (*arg*⁻) x 168 (*ade*⁻).

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 21.

Tableau 21 : Densité des suspensions initiales avec ou sans traitement au PEG et nombre de clones développés sur MM pour environ 5×10^4 protoplastes.

Traitement	Densité sur CM	Nbre de clones sur MM pour environ 5×10^4 protoplastes	% de survivants après PEG
168 + 78 sans PEG	$6,3 \times 10^5$	0	-
168 + 78 avec PEG	$7,6 \times 10^4$	0	12 %
168 + 381 sans PEG	8×10^5	0	-
168 + 381 avec PEG	4×10^4	0	5 %
381 + 78 sans PEG	$7,6 \times 10^5$	0	-
381 + 78 avec PEG	8×10^4	0	10,5 %

Nous n'avons pu reproduire ici les résultats obtenus lors de la auparavant. En effet, bien que réalisé dans des conditions identiques,

le croisement 168 (ade^-) x 78 (leu^-) n'a donné lieu à aucun produit de fusion. Les autres croisements n'ayant pas non plus engendré de clones prototrophes, il semble qu'une procédure plus efficace soit à rechercher. L'étude de différentes concentrations en PEG n'ayant pas donné de résultats satisfaisants, nous avons envisagé d'étudier l'influence du pH et de la concentration en ions Ca^{++} sur la fusion de notre matériel.

6) INFLUENCE DU pH ET DES IONS Ca^{++}

La relation mise en évidence par ANNE et PEBERDY (1975) entre concentration en ions Ca^{++} et pH nous a incité à étudier son effet dans nos conditions d'expérience. Les auteurs ayant obtenu des fréquences de fusion d'environ 4 % avec une solution de PEG à 30 % contenant 0,6 M $CaCl_2$ et 0,05 M glycine ajusté à pH 9, nous avons comparé cette solution à celle utilisée précédemment, à savoir PEG 35 % contenant 0,01 M $CaCl_2$ et 0,05 M glycine à pH 7,5. Toutefois, afin de ne pas faire intervenir un facteur supplémentaire, la concentration en PEG a été amenée pour les deux solutions à 35 %. Seuls les mutants 168 (ade^-) et 78 (leu^-) issus de la souche 1135, ont fait l'objet de cette étude.

- *Discussion* : Comme le montre le tableau 22, l'augmentation simultanée du pH et de la concentration en $CaCl_2$, si elle entraîne une perte importante de viabilité, n'a pas conduit à l'obtention de produits de fusion. Il en est de même avec la solution témoin qui nous avait paru efficace mais qui, à l'image de la série précédente, n'a donné aucun résultat.

Devant un tel phénomène, plusieurs hypothèses restent possibles. Tout d'abord il se peut que nous n'ayons pas encore trouvé la solution de PEG qui convienne à la fusion de notre matériel. Toutefois, les données bibliographiques ne laissent pas supposer une influence primordiale de la concentration en PEG puisque la plupart des auteurs ont obtenu des produits de fusion pour de larges gammes de concentrations. Nous même, après avoir testé 6 concentrations de PEG, n'avons pas trouvé une efficacité plus grande de l'une ou l'autre. Il se peut alors que le pH et la concentration en Ca^{++} soient critiques. Cependant, là encore, des fusions se produisent dans des solutions où le PEG est le seul composant (ANNE et PEBERDY, 1975).

Il est clair dans ces conditions, que d'autres paramètres doivent intervenir. On peut penser en particulier à des chocs mécaniques tels qu'une vitesse de

centrifugation plus importante après dilution du PEG qui permettrait d'augmenter la coalescence des protoplastes. La durée d'incubation et la température à laquelle elle s'effectue peuvent également jouer un rôle puisque toutes deux affectent de façon importante la viabilité.

Cependant, le temps nous a manqué pour envisager ces différents aspects du problème. De plus, nous avons signalé au chapitre III que l'obtention des protoplastes n'était pas encore optimisée de sorte que nous ne pouvions faire varier qu'un nombre restreint de conditions dans chaque série expérimentale. Les conclusions que nous pouvons toutefois tirer de ces essais, sont d'une part que la régénération des protoplastes, après traitement du PEG, reste dans la limite de celles obtenues par d'autres chercheurs, soit environ 10 % de survivants, d'autre part que l'aggrégation des protoplastes est favorisée par leur maintien pendant 20 heures à 4°C dans le complexe lytique avant l'étape de fusion. A partir de ces données, une étude systématique pourrait être faite mais elle sera conditionnée par la quantité de protoplastes disponibles pour chaque expérimentation.

Tableau 22 : Densité des suspensions initiales avec ou sans traitement au PEG et nombre de clones développés sur MM pour environ 5×10^4 protoplastes.

<i>Traitement</i>	<i>Densité sur MC</i>	<i>Nbre de clones sur MM pour environ 5×10^4 protoplastes</i>	<i>% de survivants</i>
<i>168 + 78 sans PEG</i>	5×10^6	0	100 %
<i>168 + 78 0,6 M CaCl_2 pH 9</i>	$5,5 \times 10^5$	0	11 %
<i>168 + 78 0,01 M CaCl_2 pH 7,5</i>	$1,3 \times 10^5$	0	3 %

C O N C L U S I O N

En dépit de voies de recherches différentes, nous n'avons pu résoudre le problème posé par l'établissement d'un stade hétérocaryotique, lors de confrontations impliquant des mutants issus de chacune des deux souches. Par voie de conséquence, l'étude que nous nous étions proposé n'a pu aboutir. Si l'on veut tirer des conclusions de cette approche génétique, une seule s'impose : la nécessité de poursuivre cette méthodologie malgré les difficultés rencontrées. Peu de travaux, en effet, font état de recombinaisons d'un caractère de production enzymatique entre souches de diverses origines. La raison principale de ce phénomène tient sans doute au fait que pour bon nombre d'espèces fongiques d'importance industrielle, la sexualité est soit altérée soit inexistante et, lorsqu'il est présent, le cycle parasexuel ne fonctionne pas toujours avec la même efficacité quelle que soit la souche étudiée. Lorsque seule l'anastomose est un facteur limitant à la recombinaison parasexuelle, la fusion de protoplastes peut remplacer avantageusement les confrontations entre thalles mutants. Cependant, la mise au point de cette technique est délicate. Une solution possible à ce problème est sans doute d'avoir à sa disposition une collection de souches plus importante afin de sélectionner celles qui, aisément, donnent naissance à des hétérocaryons. Toutefois, il n'est pas sûr alors que la différence d'activité α -amylase de ces souches soit suffisante pour observer avec certitude des individus recombinés pour ce caractère.

Le choix du matériel de départ est donc primordial si l'on veut obtenir de bons résultats et, vraisemblablement, nos exigences vis-à-vis des souches à utiliser le limitent. Cependant, il semble que ce soit là le seul problème réel. Certains essais réalisés en cultures agitées, à la fois sur des hétérocaryons, des diploïdes et des recombinés mutants de la souche 1135, nous ont montré que leur croissance et leur production d' α -amylase n'étaient pas altérées par leur état nucléaire, hormis les doubles mutants pour lesquels la présence de deux auxotrophies perturbe sensiblement la physiologie.

La comparaison des taux de production d' α -amylase de produits recombinaisonnés est donc tout à fait possible, si les problèmes rencontrés pour leur obtention sont résolus. Il est probable alors, qu'à l'aide des résultats obtenus dans la partie physiologique, sur la biosynthèse d' α -amylase, une interprétation des recombinaisons génétiques de ce caractère puisse être faite.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La mise au point d'un procédé de fermentation optimal, nécessite une connaissance approfondie de la physiologie du microorganisme utilisé et des mécanismes qui régissent la biosynthèse de l'enzyme désirée. Dans bien des cas cependant, certains de ces aspects demeurent mal connus et leur compréhension requière une étude détaillée. Le problème s'étant posé pour l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*, nous nous sommes vu confier par la Société RAPIDASE, l'étude des facteurs intervenant dans la biosynthèse et la régulation de cette enzyme. Confronté à ce problème et après lecture des travaux antérieurement réalisés, il nous a semblé qu'une meilleure compréhension pouvait venir de l'analyse comparative de souches dont les taux de production étaient très éloignés. En effet, s'il était possible de rapporter à ces phénomènes particuliers leur différence d'activité α -amylase, leur étude permettrait non seulement une connaissance plus fine des mécanismes impliqués dans la biosynthèse, mais encore la possibilité d'agir sur eux afin de les orienter dans le sens d'une production accrue d'enzyme, remplaçant alors une sélection au hasard par une sélection plus dirigée.

L'approche du problème a donc été double. D'une part nous avons voulu mettre en évidence les différences physiologiques des souches par l'analyse de leur comportement en culture ; d'autre part, nous avons envisagé leur recombinaison génétique afin de vérifier sur des clones recombinés les hypothèses que nous avons formulées.

Les résultats obtenus lors des cultures agitées nous ont d'emblée montré l'existence de différences notables dans la physiologie des souches, concernant à la fois l'évolution de leur croissance, leur profil de pH et leur activité α -amylase quelles que soient les conditions culturales. Nous avons pu montrer en particulier qu'une relation stricte liait croissance et pH pour l'une des souches alors qu'on notait l'absence de corrélation entre ces deux paramètres pour l'autre. Cependant, ce système d'étude ne nous permettait pas de faire le lien entre les propriétés observées et le niveau de production de l'enzyme. Nous nous sommes tourné alors vers l'utilisation de protoplastes afin d'éliminer de l'expérimentation trois facteurs susceptibles d'intervenir : la paroi cellulaire, la croissance et l'évolution du pH.

Grâce à l'utilisation des protoplastes, nous avons pu montrer que la différence d'activité des souches résultait sans doute de leurs capacités plus ou moins grandes à transcrire de nouveaux ARN messagers d' α -amylase et que la paroi, bien que pouvant jouer un rôle dans la régulation, n'était pas à l'origine de l'écart de production enregistré. Cependant, nous ne connaissions pas les raisons pour lesquelles cette transcription *de novo* d'ARN messagers demeurait faible pour la souche 1135. Nous avons entrepris alors d'étudier plus en détails la relation liant la nature du substrat carboné à la synthèse d' α -amylase. Ceci nous a permis d'émettre une hypothèse sur l'importance du métabolisme oxydatif dans cette biosynthèse et comparativement, de montrer que les taux de synthèse peu élevée de la souche 1135, pouvaient être liés à la dérégulation de ses voies réductrices.

Toutefois, il reste aujourd'hui à montrer par quels mécanismes le métabolisme oxydatif intervient dans l'induction proprement dite et cette étude peut revêtir plusieurs aspects. D'une part, il semble primordial de mettre en évidence les points du métabolisme pour lesquels les deux souches diffèrent. Ceci pourra être réalisé par l'analyse des acides organiques excrétés en culture par la souche 1135 et le dosage de certaines enzymes importantes des cycles oxydatif et réducteur. D'autre part, il nous paraît essentiel d'étudier un échantillonnage de souches plus conséquent afin de vérifier les hypothèses émises et de les généraliser.

L'étude physiologique conduite à l'aide de protoplastes ouvre également une voie de recherche intéressante dans la mesure où l'influence de nombreux substrats carbonés et azotés sur la biosynthèse d' α -amylase peut être étudiée sur des microquantités et dans des conditions où la croissance et le pH ne peuvent jouer un rôle de facteurs limitants.

La seconde partie de notre travail nous a posé de nombreux problèmes.

Bien que des clones recombinés aient été obtenus à partir de mutants issus de la souche 1135, la réalisation du cycle parasexuel chez *Aspergillus oryzae* est rendue complexe par le fait qu'aucune étape de ce cycle ne se produit spontanément. Par ailleurs, l'efficacité des anastomoses naturelles à induire l'hétérocaryose semble dépendre essentiellement des souches employées. A cet égard, l'étude de souches plus nombreuses devrait sans doute permettre la recombinaison d'isolats d'origines différentes. Il est possible toutefois que la mise au point d'une technique de fusion de protoplastes puisse conduire à la recombinaison de deux souches incapables de s'anastomoser par d'autres voies. Cependant, les résultats que nous avons obtenus montrent que seule une étude systématique peut y parvenir. Malgré les difficultés rencontrées, l'obtention de produits recombinés doit faire l'objet de recherches plus étendues, car à l'heure actuelle, aucune étude ne fait état des possibilités de recombinaison du caractère "production d' α -amylase" chez *Aspergillus oryzae* et tant au niveau fondamental que dans ses implications industrielles, une réponse est attendue.

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

- ANDRZEJCZUK-HYBEL J. et J. KACZKOWSKY, 1971a. - Conditions and course of accumulation and excretion of amylase in culture of *A. oryzae*. *Bull. Acad. Polonaise des Sc.* 19 (5) : 313-316.
- ANDRZEJCZUK-HYBEL J. et J. KACZKOWSKY, 1971b. - The purification and preliminary characterization of *A. oryzae* CLPS Amylases. *Bull. Acad. Polonaise des Sc.* 19 (7-8) : 451-457.
- ANNE J. et J.F. PEBERDY, 1975. - Condition for induced fusion of Fungal protoplasts in polyethylene glycol solutions. *Arch. Microbiol.* 105 : 201-205.
- ANNE J. et J.F. PEBERDY, 1976. - Induced fusion of protoplasts following treatment with polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.* 92 : 413-417.
- ATWOOD K.C. et T.H. PITTENGER, 1955. - The efficiency of nuclear mixing during heterocaryon formation in *Neurospora crassa*. *Amer. J. Bot.* 42 : 496-500.
- BEADLE G.V. et V.L. COONRADT, 1944. - Heterocaryosis in *Neurospora crassa*. *Genetics* 29 : 291-308.
- BENNETT J.W., C.H. VINNETT et W.R. GOYNES Jr., 1980. - Aspects of parasexual analysis in *Aspergillus parasiticus*. *Can. J. Microbiol.* 26 (6) : 706-713.
- BERTOLDI M. et C.E. CATEN, 1979. - The production of heterozygous diploids and haploidization analysis in *Aspergillus amstelodami*. *Genetical Research* 34 (3) : 239-252.
- CONSTABEL F. et K.N. KAO, 1974. - Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethylene glycol. *Can. J. Bot.* 52 : 1603-1606.

- DEPREZ J., 1977. - Rapport de travail sur *Aspergillus oryzae*. Laboratoire de Cryptogamie, Université de Lille I.
- FENIKSOVA R.V., G.I. KVESIDATZE et A.K. KULIKOVA, 1969. - Kinetics of α -amylase biosynthesis by *Aspergillus oryzae* and the effect of analogs of nitrogenous bases on α -amylase biosynthesis. *Microbiologiya* 38 (6) : 994-998.
- FERENCZY L., F. KEVEI et M. SZEGEDI, 1975a. - Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *Experientia* 31 (1) : 50-52.
- FERENCZY L., KEVEI F. et M. SZEGEDI, 1975b. - High frequency fusion of fungal protoplasts. *Experientia* 31 (9) : 1028-1030.
- FINCHAM J.R.S., P.R. DAY et A. RADFORD, 1979. - Fungal Genetics. 4ème édition, Edit. Blackwell Scientific Publications.
- FRIEDMANN T. et Ch.J. EPSTEIN, 1967. - The role of calcium in the reactivation of reduced taka-amylase. *J. biol. chem.* 242 (21) : 5131-5140.
- GRINDLE M., 1963a. - Heterocaryon compatibility of unrelated strains in the *A. nidulans* group. *Heredity* 18 : 191-204.
- GRINDLE M., 1963b. - Heterocaryon compatibility of closely related strain in the *A. nidulans* group. *Heredity* 18 : 397-405.
- HASTIE A.C., 1967. - Mitotic recombination in conidiophore of *Verticillium albo-atrum*. *Nature* 214 : 249-252.
- HASTIE A.C., 1970. - Benlate induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature* 226 : 771.
- HEARN V.M., E.V. WILSON et D.W.R. MACKENZIE, 1980. - The preparation of protoplasts from *Aspergillus fumigatus* mycelium. *Sabouraudia* 18 : 75-77.
- IKEDA Y., K. NAKAMURA et C. ISHITANI, 1957. - A high frequency of heterozygous diploids and somatic recombination induced in imperfecti fungi by ultraviolet light. *J. Gen. appl. microbiol.* 3 (1) : 1-11.
- ISHITANI C. et K. SAKAGUCHI, 1955a. - Hereditary variation and genetic recombination in KOJI MOLDS (*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*) : I. Natural variation. *J. Gen. appl. microbiol.* 1 (4) : 246-257.
- ISHITANI C. et K. SAKAGUCHI, 1955b. - Hereditary variation and genetic recombination in KOJI MOLDS (*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*) : II. Morphological mutations. *J. Gen. appl. microbiol.* 1 (4) : 258-271.
- ISHITANI C., Y. IKEDA et K. SAKAGUCHI, 1955c. - Hereditary variation and genetic recombination in KOJI MOLDS (*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*) : III. Biochemical mutations. *J. Gen. appl. microbiol.* 1 (4) : 272-282.
- ISHITANI C. et K. SAKAGUCHI, 1955d. - Hereditary variation and genetic recombination in KOJI MOLDS (*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*) : IV. Cytological studies. *J. Gen. appl. microbiol.* 1 (4) : 284-297.
- ISHITANI C. et K. SAKAGUCHI, 1956a. - Hereditary variation and genetic recombination in KOJI POLDS (*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*) : V. Heterocaryosis. *J. Gen. appl. microbiol.* 2 (4) : 345-400.

- ISHITANI C., K. IKEDA et K. SAKAGUCHI, 1956b. - Hereditary variation and genetic recombination in KOJI MOLDS (*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*): VI. Genetic recombination in heterozygous diploids. *J. Gen. appl. microbiol.* 2 (4) : 401-430.
- ISHITANI C., K. UCHIDA et Y. IKEDA, 1956c. - The relation of DNA content to cell size in *Aspergillus*. *Exp. Cell. Research* 10 : 737-740.
- KÄFER E., 1961. - The process of spontaneous recombination in vegetatives nuclei of *A. nidulans*. *Genetics* 46 : 1581-1609.
- KEVEI F. et J.F. PEBERDY, 1977. - Interspecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. *J. gen. microbiol.* 102 : 255-262.
- KEVEI F. et J.F. PEBERDY, 1979. - Induced segregation in interspecific hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. *Molec. gen. genet.* 170 (2) : 213-218.
- KOZYRIOVA G.T., 1971. - Regulation of formation of amylase in *Aspergillus oryzae*. *Westn. Mesk. Univ. ser. 6 biol. Pochvoved* 26 (4) : 115-116.
- KUNDU A.K. et S. DAS, 1970. - Production of amylase in liquid culture by a strain of *A. oryzae*. *Appl. microbiol.* 19 (4) : 598-603.
- KUNDU A.K., S. DAS et T.K. GUPTA, 1972. - Influence of culture and nutritional conditions on the production of amylase by the submerged culture of *A. oryzae*. *J. Fermet. technol.* 51 (2) : 142-150.
- LAPIERRE H., J.M. LEMAIRE, B. JOUAN et M. MOLIN, 1970. - Mise en évidence de particules virales associées à une perte de pathogénicité chez le piétin-échaudage des céréales, *Ophiobolus graminis*. *C.R. Acad. Sc., série D* 271 : 1833-1836.
- LHOAS P., 1961. - Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with p-fluorophenylalanine. *Nature* 190 : 744.
- LOWRY O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL, 1951. - Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. chem.* 193 : 265-275.
- MAKOUNZI J.A., 1978. - Recombinaison mitotique et variation du pouvoir pathogène chez *Pyricularia oryzae*. *Thèse 3ème Cycle, Université Paris-Sud, Orsay.*
- MALKOV A.M. et V.E. DEEVA, 1961. - Effect of the partial inhibition of respiration in the fungus *Aspergillus oryzae* on the synthesis of biomass, P. content and amylolytic activity. *Microbiologyia* 30 : 229-235.
- MEYRATH J., 1975. - Interdependence of inoculum size, method of cultivation and substrate composition in amylase production and growth of *Aspergillus oryzae*. *Zbl. Balet. Abt. II*, 119 : 53-73.
- MORRIS N.R. et C.E. DAKLEY, 1979. - Evidence that p-fluorophenylalanine has a direct effect of tubulin in *Aspergillus nidulans*. *J. gen. microbiol.* 114 (2) : 449-454.
- NAGATA T. et I. TAKEBE, 1970. - Coloration des composés pectiques au calcofluor. *Planta* 92 : 301-308.

- NELSON N., 1944. - A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153 : 375-380.
- NG M.L., J.E. SMITH et A.F. Mc INTOSH, 1973. - Changes in activity of tricarboxylic acid cycle and glyoxylate cycle enzymes during synchronous development of *Aspergillus niger*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 61 : 13-20.
- NORMAN R.A. et S. PRAKASH, 1980. - Developmental variation in amylase allozyme activity associated with chromosome inversion in *Drosophila persimilis*. *Genetics* 95 (4) : 1001-1011.
- PEBERDY J.F., 1980. - Protoplast fusion a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enzyme microbial Technol.* 2 (1) : 23-29.
- PEBERDY J.F. et S. ISAAC, 1976. - An improved procedure for the isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans*. *Microbios letters.* 3 : 7-9.
- PONTECORVO G., 1956. - The parasexual cycle in fungi. *Ann. Rev. microbiol.* 10 : 393-400.
- SMITH R.A. et I.C. GUNSALUS, 1955. - Distribution and formation of isocitratase. *Nature* 175 : 774-775.
- SMIRNOVA L.S., 1955. - Influence of nitrogen in its reduced and oxidized states in media on amylase formation by *Aspergillus oryzae*. *Microbiologya* 25 : 423-428.
- SOMOGYI M., 1952. - Note on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195 : 19-23.
- TACHIBANA S. et T. MURAKAMI, 1974. - Effects of carbon dioxide sources and other compounds on L-malate fermentation utilizing ethanol. *J. ferm. Technol.* 52 : 353-359.
- THOM Ch. et K.B. RAPER, 1945. - Manual of the *Aspergilli*. *The Williams and Wilkins Company*.
- THORBEC L. et P. EPLOV, 1974. - The formation general characteristics and production of α -amylase in heterocaryons and diploids of *A. oryzae*. *J. appl. Bact.* 37 : 549-557.
- THORN M.B., 1953. - Inhibition by malonate of succinic dehydrogenase in heart-muscle preparation. *Biochem. J.* 54 : 540-547.
- TONOMURA K., H. SUZUKI, N. NAKAMURA, K. KURAYA et O. TANABE, 1961. - On the inducers of α -amylase formation in *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.* 25 (1) : 1-6.
- TONOMURA K., F. FUTAI et O. TANABE, 1963. - Cell bound α -amylase in *Aspergillus oryzae*. 2. Stimulation of α -amylase liberation with phosphopeptids. *Rep. Ferment. Res. Inst.* 24 : 35-43.
- TURIAN G., 1960a. - Déficiences du métabolisme oxydatif et différenciation sexuelle chez *Allomyces* et *Neurospora*. Activité d'une DPN-deshydrogénase lactique chez *Allomyces*. *Path. Microbiol.* 23 : 687-699.

- TURIAN G., 1960b. - Indices d'un fonctionnement compensatoire du cycle glyoxylique lors de la différenciation mâle chez *Allomyces* et *Neurospora*. *Bull. Soc. Bot. Suisse* 70 : 451-458.
- UEDA S., B.C. SAHA et T. MITSUE, 1979. - Glucoamylase produced by submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *Starke* 31 (9) : 307-313.
- VALLIER P., J. BATA et L. COLOBERT, 1977. - Conditions optimales de production d' α -amylase en milieu liquide par *Aspergillus oryzae*. *Ann. Microbiol.* 128B : 359-371.
- VANDENBROEK H.W.J., H.G. STUNNENBERG et C.M.J. WENNEKES, 1979. - Protoplasts from *Aspergillus nidulans*. *Microbios* 26 (104) : 115-128.
- WOOD B.J.B., 1977. - Oriental food uses of *Aspergillus*. In : Genetics and physiology of *Aspergillus* (ed. E. SMITH et J.A. PATEMAN, Acad. Press) : 481-498.
- YABUKI M. et S. FUKUI, 1970. - Presence of binding site for α -amylase and of masking protein for this site on mycelial cell wall of *Aspergillus oryzae*. *J. Bacteriol.* 104 (1) : 138-144.
- YABUKI M., N. ONO, K. HOSHINO et S. FUKUI, 1977. - Rapid induction of α -amylase by non-growing mycelia of *Aspergillus oryzae*. *Appl. environment. Microbiol.* 34 (1) : 1-6.
- YURKEVITCH V.V. et G.T. KOZYRIOVA, 1967. - Participation de la protéine enzymatique active dans la régulation de sa formation. *Dokl. Akad. Nauk.* 177 (1) : 240-242.
- YURKEVITCH V.V. et G.T. KOZYRIOVA, 1972. - Rôle de la paroi cellulaire dans la régulation de la biosynthèse de l' α -amylase chez *Aspergillus oryzae*. *Dokl. Akad. Nauk.* 204 (3) : 740-743.
- ZICKLER D., 1973. - La méiose et les mitoses au cours du cycle de quelques Ascomycètes. *Thèse Sciences Naturelles, Université Paris-Sud, Orsay.*

