

N° d'ordre : 563

50376  
1982  
187

50376  
1982  
187

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES**

par

Lucien DUJARDIN

**MORPHOGENESE DE *CANDIDA ALBICANS* (ROBIN) BERKHOUT :  
ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA CHLAMYDOSPORULATION ET  
INTERPRETATION A L'AIDE DE LA THEORIE DES CATASTROPHES.**



Soutenu le 10 Novembre 1982 devant la Commission d'Examen

MM.	J. BIGUET	Professeur à l'Université de Lille II
	J.P. BRASSELET	Professeur à l'Université de Lille I
	G. GOMA	Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse
	L. LACOSTE	Professeur à l'Université de Lille I
	F. MARIAT	Professeur à l'Institut Pasteur, Paris
	Ph. VERNET	Professeur à l'Université de Lille I

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

*La formation d'un chercheur devrait être assurée, selon moi, dans le cadre d'un compagnonnage. Cela signifie une certaine forme de transmission du savoir professionnel dans laquelle se mêlent tradition et innovation, tout cela dans un esprit de fraternité. Je pense que personne ne peut bien travailler au sein d'une équipe s'il ne se sent pas entouré d'amitié. J'ai eu la chance de vivre de cette manière et j'ai grand plaisir à remercier ici maîtres et compagnons :*

A mon arrivée dans le laboratoire de Monsieur BIGUET, je n'avais aucune sympathie pour les Champignons ; c'est Mademoiselle ANDRIEU qui, par son enthousiasme, a su me familiariser avec la mycologie et m'attacher à cette discipline. Aussi, sans aucun respect pour le protocole, c'est à elle que va tout d'abord ma reconnaissance.

Messieurs BIGUET et LACOSTE ont dirigé mon travail de recherche de manière tout à fait complémentaire : Monsieur BIGUET a canalisé mon énergie, dirigé mes efforts et permis que je m'aventure sur la voie de la théorie des catastrophes. L'évolution de ma pensée a été possible grâce à l'ambiance si particulière qu'il a créée dans son laboratoire de l'Unité 42 de l'INSERM. Monsieur LACOSTE m'a appris à poser des questions aux Champignons, à conduire les expériences avec rigueur et à analyser les réponses obtenues ; il m'a enseigné les exigences du travail expérimental et il ne m'a pas abandonné lorsque je lui ai présenté l'interprétation de mes résultats à l'aide de la théorie des catastrophes. J'ai toujours trouvé dans son laboratoire de Cryptogamie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille un accueil chaleureux.

Je me suis adressé à Monsieur BRASSELET pour analyser, discuter et critiquer les aspects mathématiques de mon travail. Il ne s'est pas contenté de donner son avis, nous avons travaillé ensemble, et bien que récente, notre rencontre a été très fructueuse ; l'intérêt qu'il porte aux faits biologiques laisse entrevoir la poursuite de notre collaboration.

Monsieur GOMA a accepté lui aussi d'analyser mon travail et mes réflexions. Il l'a fait avec beaucoup d'attention et de minutie ; je lui suis reconnaissant d'avoir intéressé à mes idées les chercheurs de son laboratoire de l'INSA à Toulouse. Les discussions que nous avons eues ont fait évoluer mes conceptions.

Monsieur MARIAT a suivi mes résultats au fil des réunions de la Société française de Mycologie Médicale ; ses encouragements m'ont aidé à poursuivre mon travail et sa présence dans mon Jury me fait un très grand plaisir.

Monsieur VERNET s'est vu confier la tâche difficile de juger cette Thèse dans une spécialité différente de la sienne. Je le remercie de l'effort qu'il accepte de faire pour moi et souhaite qu'il trouve dans sa lecture de quoi retenir son attention.

Certaines expériences ont requis la présence ininterrompue d'un chercheur pendant plus de 24 heures. Elles auraient été irréalisables sans la collaboration de Madame WALBAUM. J'ai bénéficié de ce travail en commun tout au long de l'étude expérimentale. Par ses discussions et l'intérêt porté à mes élucubrations, elle a aidé à la formulation de ma pensée.

Je ne saurais négliger l'aide technique apportée par Madame MORTUAIRE dans la mise en oeuvre des expériences, ni le travail de présentation et de dactylographie réalisé avec soin par Madame LECOCQ.

Il m'est impossible de nommer toutes les personnes qui m'ont aidé ; nous ne sommes d'ailleurs pas toujours conscients des services que nous recevons ou que nous donnons. Que tous ceux qui se sentent concernés par l'édification de cette Thèse, qu'ils aient été ou non cités, soient assurés de mon amitié et de ma reconnaissance.

# S O M M A I R E

INTRODUCTION .....	1
I. CANDIDA ALBICANS .....	5
I.1 QU'EST-CE QUE C'EST ?.....	5
I.2 MORPHOLOGIES ET MORPHOGENESE.....	8
1.2.1 Morphologies.....	8
1.2.2 Morphogenèse.....	14
I.3 NOTRE ATTITUDE FACE A CES FAITS.....	18
II. ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA CHLAMYDOSPORULATION DE CANDIDA ALBICANS.....	21
II.1 INTRODUCTION.....	21
2.1.1 Brève revue bibliographique.....	21
2.1.2 Notre but, nos principes.....	23
II.2 ETUDE DU MILIEU DE CULTURE.....	26
2.2.1 Approche en milieu de culture naturel.....	26
2.2.1.1 influence de la concentration de glucose et de la densité d'ensemencement	
2.2.1.2 influence de la concentration de glucose et de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
2.2.1.3 influence de la concentration de glucose et de $\text{KH}_2\text{PO}_4$	
2.2.1.4 influence de la concentration de glucose et de biotine	
2.2.1.5 influence de $\text{MgSO}_4$ , $\text{CaCl}_2$ , $\text{FeCl}_2$ , $\text{CuSO}_4$ , $\text{ZnSO}_4$	

2.2.1.6	<i>influence des conditions de préculture</i>	
2.2.1.7	<i>conclusion</i>	
2.2.2	Formulation de milieux synthétiques.....	42
2.2.2.1	<i>pourquoi rechercher des formules de milieux synthétiques ?</i>	
2.2.2.2	<i>étude de variations quantitatives</i>	
2.2.2.3	<i>variations qualitatives</i>	
2.2.2.4	<i>discussion et conclusion</i>	
II.3	DEROULEMENT DE LA MORPHOGENESE.....	63
2.3.1	Méthodes.....	64
2.3.2	Etapes de la morphogenèse.....	64
2.3.3	Influence de la lumière.....	68
2.3.4	Influence de la densité d'ensemencement.....	70
2.3.5	Conclusion.....	72
II.4	PHENOMENES RESPIRATOIRES ET PRODUCTION DES CHLAMYDOSPORES... ..	72
2.4.1	Influence de la lamelle.....	73
2.4.2	Influence d'inhibiteurs respiratoires : antimycine A et acide salicyl-hydroxamique.....	76
2.4.3	Influence du chloramphénicol.....	79
2.4.4	Discussion.....	81
II.5	CONCLUSION.....	83
III.	THÉORIE DES CATASTROPHES ET MORPHOGENESE DE CANDIDA ALBICANS .....	87
III.1	LA THEORIE DES CATASTROPHES.....	87
3.1.1	Présentation.....	87
3.1.2	Un exemple : la machine de ZEEMAN.....	89
3.1.3	Les catastrophes élémentaires.....	96
III.2	INTERPRETATION DE LA CHLAMYDOSPORULATION DE C. ALBICANS EN CULTURE "BATCH".....	101
3.2.1	Choix et définitions.....	101
3.2.2	Le système est le microorganisme.....	104
3.2.2.1	<i>interprétation de faits exposés précédemment</i>	
3.2.2.2	<i>expérimentation complémentaire : déplacement de frontière dans des gradients</i>	
3.2.3	Le système est le contenu de la fiole de culture....	115
3.2.3.1	<i>analogie avec la machine de ZEEMAN</i>	
3.2.3.2	<i>modèle "hydrologique" de la morphogenèse de Candida albicans</i>	

III.3	MORPHOGENESE DE CANDIDA ALBICANS EN CULTURE CONTINUE.....	121
3.3.1	Principes de la culture continue.....	121
3.3.2	Exemples de catastrophes en culture continue.....	124
3.3.2.1	<i>taux de dilution critique</i>	
3.3.2.2	<i>états d'équilibre multiples</i>	
3.3.3	Etudes morphogénétiques en culture continue.....	128
3.3.4	Travaux personnels.....	129
3.3.4.1	<i>transformation levure ↔ mycélium</i>	
3.3.4.2	<i>évolution vers l'équilibre des cultures continues à 28°C</i>	
3.3.4.3	<i>obtention de chlamydozoospores en état d'équilibre</i>	
3.3.4.4	<i>discussion</i>	
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	139
	BIBLIOGRAPHIE .....	145

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

Les résultats expérimentaux qui sont le fondement de cette Thèse ont été obtenus à l'Unité 42 de l'Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM). Ceci permet de comprendre comment nous avons été amené à nous intéresser à *Candida albicans*, Champignon pathogène de l'Homme, à ses changements de morphologie et plus particulièrement à la formation de ses chlamydospores.

Pour diverses raisons, à partir de 1975, les activités mycologiques de l'Unité 42 ont dû être recentrées. La décision fut prise de ne plus étudier qu'un seul microorganisme, le Champignon levuriforme *Candida albicans*.

Peu de temps auparavant, la curiosité de certains avait été éveillée par une difficulté au cours du tournage du film didactique "Diagnostic biologique des Candidoses". Le scénario prévoyait une séquence montrant au ralenti la formation des chlamydospores de *Candida albicans*. Après plusieurs essais, la scène n'avait pu être réussie : les chlamydospores apparaissaient toujours en dehors du champ filmé. Ce fut le point de départ des travaux d'ANDRIEU et Coll. (1, 2) sur ce phénomène de photoinhibition de la chlamydosporulation de *C. albicans*.

L'intérêt se trouvait donc focalisé sur cette chlamydo-spore et plusieurs projets d'étude furent envisagés. Mais il fallait en premier lieu préciser les conditions d'obtention de ces "fameuses" chlamydo-spores. En effet, on ne connaissait que des recettes empiriques et peu précises pour les obtenir. Il semblait, de plus, intéressant de pouvoir travailler en milieu liquide, ne serait-ce que pour pouvoir récupérer facilement le Champignon après culture.

Les premiers résultats concernant la production des chlamydo-spores ont été obtenus facilement et rapidement, ce qui nous a encouragé à poursuivre l'étude de ce phénomène. Le choix du sujet de notre Thèse en découlait. La suite de notre étude morphogénétique aurait pu être classique, mais un jour de 1977 nous sommes sorti des sentiers battus : nous venions de lire un article paru dans "la Recherche" à propos de la théorie des catastrophes (30).

La théorie des catastrophes est le résultat des travaux du mathématicien THOM et veut être une théorie dynamique de la morphogénèse (112). Nous sentons alors confusément que cette théorie pourra nourrir notre réflexion et sans doute nous aider à décrire le phénomène de chlamydo-spore. Les travaux de ZEEMAN (135) montrent des applications à des domaines très variés et font progresser notre pensée : la théorie des catastrophes vise à décrire des phénomènes dans lesquels des variations continues de certains paramètres externes produisent des variations soudaines d'une variable. Dans les cultures en fioles, l'un des paramètres externes est le temps, qui varie bien sûr de manière continue mais qui échappe à la volonté de l'expérimentateur. La théorie des catastrophes permet la description des changements de morphologie dans ces cultures ; les modèles ainsi obtenus sont qualitatifs. Afin d'obtenir des modèles quantitatifs, nous avons voulu contrôler tous les paramètres, ce qui signifie supprimer le paramètre temps. Les techniques de culture continue permettent de maintenir des équilibres (indépendants du temps). Là, il faut comprendre que nous décidions de changer de système ; nous voulions construire un "super-système" dans lequel le microorganisme et son environnement se placent sur un état d'équilibre.

Nous avons obtenu assez facilement, et presque par hasard, la transformation levure-mycélium en culture continue ; par contre il ne nous a pas été possible de maîtriser, malgré d'importants efforts, la culture



continue du pseudomycélium, ni celle des chlamydo-spores. Les difficultés que nous avons rencontrées témoignent de notre méconnaissance, même après une étude physiologique classique, des seuils que doivent franchir les paramètres pour obtenir le phénomène désiré.

Le plan de notre Thèse nous fera d'abord faire connaissance avec *Candida albicans*, ses différentes formes et leurs changements, nous essaierons ensuite de montrer les apports d'une étude physiologique à la connaissance du phénomène de chlamydo-spore. Enfin, nous ferons partager nos réflexions sur la théorie des catastrophes appliquée à la morphogenèse de *Candida albicans*.



## I. CANDIDA ALBICANS

### I.1. QU'EST-CE QUE C'EST ?

*Candida albicans*, qu'est-ce que c'est ? La réponse à cette question sera une définition subjective, c'est à dire qui fera référence à son auteur (52). Ainsi pour un médecin, *Candida albicans* est une levure pathogène ; pour un malade atteint de candidose, *Candida albicans* est la cause de ses soucis, celui contre qui il lutte par des médicaments ; pour un responsable de laboratoire d'analyses médicales, c'est un microorganisme qu'il faut isoler et identifier le plus facilement et le plus rapidement possible ; c'est aussi, bien souvent maintenant, un germe dont il faut déterminer la sensibilité aux différents agents antifongiques ; pour le systématique, *Candida albicans* est une espèce qu'il doit s'efforcer de classer ; pour nous qui présentons ce mémoire, *C. albicans* est un microorganisme qui présente plusieurs morphologies différentes et qui nous a permis l'étude de phénomènes morphogénétiques. Nos résultats pourront, peut-être, aider le laboratoire d'analyses médicales dans sa tâche d'identification et par conséquent le médecin qui a demandé l'analyse, et finalement le malade.

Revenons sur certaines définitions : *Candida albicans*, levure pathogène : l'adjectif "pathogène" indique l'intérêt du médecin tandis que le nom "levure" classe le germe, ce qui aura des conséquences sur le traitement.

La pathogénicité de *C. albicans* se manifeste de manière très variée : on connaît des lésions des muqueuses comme le muguet buccal ou vaginal,

des lésions de la peau et des phanères : intertrigo, onyxis et perionyxis. Mais les affections à *Candida* peuvent être plus profondes et l'on connaît des candidoses des bronches, des poumons, du tube digestif et même des candidoses généralisées (73, 117).

*Candida albicans* est habituellement un organisme saprophyte dans le tube digestif de nombreux mammifères (Homme compris) et oiseaux. Il ne devient pathogène que dans des circonstances particulières ; parmi les facteurs favorisant les candidoses on cite le diabète, la grossesse, certains médicaments tels les antibiotiques, les corticostéroïdes, les antimétabolites et les immunosuppresseurs. Les cathéters intraveineux sont aussi le lieu de culture et la porte d'entrée du germe responsable de nombreuses septicémies à *Candida* (des espèces autres que *C. albicans* peuvent être incriminées).

On isole rarement *Candida albicans* de l'eau, du sol, des plantes ou de l'atmosphère. Quand on le trouve, il s'agit généralement d'une contamination fécale (47).

L'isolement à partir des lésions se fait sur le classique milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques antibactériens. L'identification rapide de *Candida albicans* est possible grâce à deux tests : formation de tubes germinatifs dans du sérum à 37°C en 3 heures et production de chlamydospores typiques en 24 à 48 heures à 28°C sur divers milieux plus ou moins efficaces (3). Mais il ne faudra pas négliger l'identification des autres espèces de *Candida*, car certaines peuvent aussi être responsables de candidoses.

Comment le systématicien classe-t-il *Candida albicans* ? Le volumineux ouvrage de LODDER traite de la classification des levures et nous sert de guide (58).

Tout d'abord le mot "levure" recouvre un concept mal défini et ne constitue pas un taxon. Une levure est un champignon qui se présente sous une forme unicellulaire pendant une grande partie de son cycle. Ce terme s'oppose à "Champignon filamenteux" ; mais certains Champignons filamenteux peuvent se présenter sous une forme unicellulaire, on dira une forme levure, pendant une courte période de leur cycle : c'est le cas des Taphrinales par exemple. On peut aussi induire en culture une phase levure chez des Champignons filamenteux qui n'en présentent pas habituellement (chez certains Mucorales par exemple).

Levure est donc un mot d'usage courant pour désigner soit un groupe hétérogène de Champignons, soit une certaine forme unicellulaire chez un Champignon. Les levures (dans les deux acceptions de ce terme), se reproduisent asexuellement par bourgeonnement le plus souvent, ou par fission, c'est à dire par division binaire, quelquefois.

Lorsqu'on connaît la reproduction sexuée d'une levure, on peut la classer et elle appartient soit aux Ascomycètes soit aux Basidiomycètes. Mais pour de très nombreuses levures on ignore la reproduction sexuée et on range, provisoirement, les espèces correspondantes parmi les Champignons imparfaits. C'est le cas de *Candida albicans*. Cette fois, le concept de levure reprend toute son importance pour isoler ce groupe des autres Champignons imparfaits, et pour tenter sinon de les classer, du moins de les nommer. On utilisera pour cela des critères morphologiques (mode de bourgeonnement, forme de la levure, présence ou absence de capsule, possibilité de former ou non du mycélium...), des critères de culture (formation d'une pellicule en milieu liquide...) et enfin des critères physiologiques (assimilation et fermentation des sucres...).

*Candida albicans* est donc une levure imparfaite ; on dit aussi levure anascosporée d'un terme assez mal choisi car certaines levures autrefois imparfaites donc anascosporées se sont révélées être des Basidiomycètes. Tant qu'une levure est imparfaite (ou plutôt que notre connaissance est imparfaite) nous ne devrions pas employer le terme d'anascosporé, pas plus que celui d'abasidiosporé.

En 1970, VAN DER WALT (118) décrit le cycle sexué de *Candida albicans* qui serait, selon lui, un Basidiomycète : *Syringospora albicans*. Les chlamydospores caractéristiques de cette espèce seraient en fait des analogues de téliospores. Les conditions expérimentales de VAN DER WALT sont très confusément décrites et personne d'autre que lui, à notre connaissance, n'a obtenu la reproduction sexuée de *Candida albicans*.

Plusieurs auteurs présentent des arguments en faveur du rattachement de *Candida albicans* aux Ascomycètes : étude par hybridation d'acides nucléiques de *C. albicans* et de levures ascomycètes ou basidiomycètes (93, 94, 95) ; étude du pourcentage de cytosine et de guanine de l'ADN de nombreuses espèces (104) ; étude de la composition de la paroi (7, 8).

Cependant la connaissance et la maîtrise des conditions de la reproduction sexuée de *Candida albicans* seraient très intéressantes : elles permettraient, bien sûr, la classification de l'espèce, mais aussi des études génétiques. Pour l'heure on discute du degré de ploïdie (74, 82, 91, 121, 122) et on est réduit à une étude génétique parasexuelle en utilisant la technique de fusion des protoplastes (82, 91).

Après avoir donné les points de vue du médecin, du biologiste en analyse médicale et du systématicien nous exposerons notre manière de regarder *Candida albicans* à travers ses différentes morphologies.

## 1.2. MORPHOLOGIES ET MORPHOGENESE

*Candida albicans* se présente sous quatre aspects : levure, pseudomycélium, mycélium, chlamydospore. Nous décrirons d'abord ces aspects puis les différentes transformations d'un aspect en un autre.

### 1.2.1. MORPHOLOGIES.

-la levure : c'est la forme la plus facilement obtenue en culture. C'est sous cette forme que le microbiologiste l'isole à partir des prélèvements. On peut également la rencontrer au cours de l'examen direct d'un prélèvement.

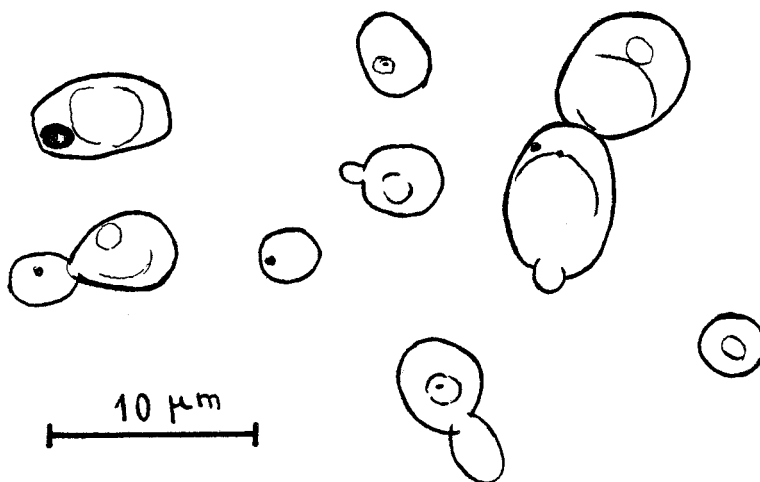
La levure est une cellule globuleuse ou légèrement ovoïde. Ses dimensions sont (3,5-6) x (6-10)  $\mu\text{m}$  selon LODDER (58) qui précise que certaines souches ont des levures plus petites ou plus grandes. Lorsqu'elle se trouve dans des conditions favorables elle se multiplie par bourgeonnement (figure 1). Des publications récentes (9, 103) analysent le cycle de division cellulaire de la levure *Candida albicans*.

En phase stationnaire, les cellules de *C. albicans* se présentent sans bourgeon et sont bloquées en un point précis du cycle de division cellulaire. Lorsqu'on transfère de telles cellules dans des conditions favorables, elles émettent, de façon synchrone, un bourgeon. Lorsque le bourgeon a atteint un volume critique, le noyau de la cellule mère migre dans l'isthme entre

cette cellule et le bourgeon puis il se divise. Cellule mère et bourgeon contiennent alors chacun un noyau et la cytotinèse se produit. La séparation des cellules mère et fille est déterminée par un système de disjonction dans la paroi, formé d'un anneau de chitine. Cet appareil de disjonction laisse des cicatrices : de naissance sur la cellule fille et de bourgeonnement sur la cellule mère. Les cicatrices de bourgeonnement sont mises en évidence par coloration au calcofluor et observation en microscopie optique à fluorescence. De cette manière on peut savoir combien de fois une cellule a bourgeonné (106).

On emploie le terme de "blastospore" pour désigner une cellule fille et par extension une levure.

Figure 1 : La forme levure de *Candida albicans* (culture de 24 h à 28°C sur milieu de Sabouraud gélosé).



-le pseudomycélium : on le trouve dans des cultures âgées sur milieu gélosé où il a tendance à s'enfoncer dans la gélose. On peut également l'obtenir sur des milieux spéciaux ; nous décrirons ces conditions plus loin. On peut encore l'observer dans les lésions ou les prélèvements à partir de celles-ci.

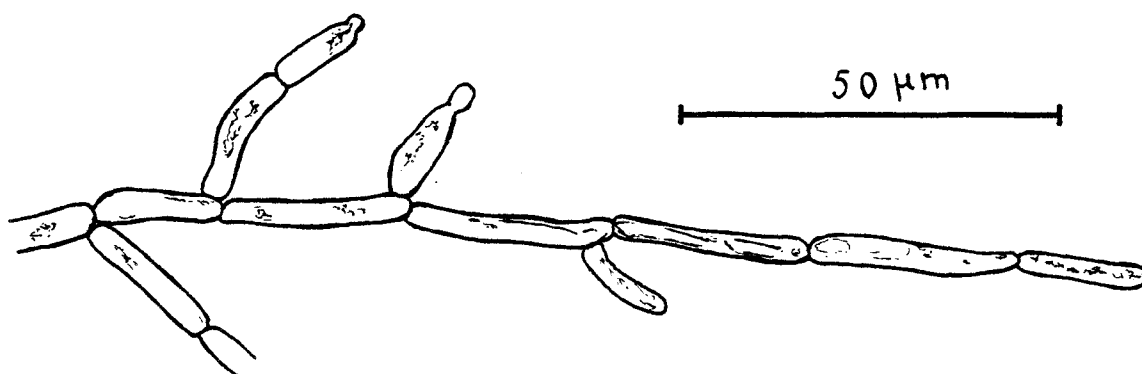
Le pseudomycélium est une structure filamenteuse formée par bourgeonnement successif de cellules allongées (58). On peut se représenter le pseudomycélium comme un ensemble de levures allongées pour lesquelles le système de disjonction ne fonctionne pas. Si on peut observer l'apex d'un

filament en croissance, il est facile de voir le bourgeonnement. S'il est impossible de voir ce bourgeonnement, on observera des constriction caractéristiques entre chaque article et cela confirmera la nature pseudomycélienne du filament (figure 2).

Il existe des formes intermédiaires entre la levure et le pseudomycélium : il s'agit de grappes ou de chaînes de cellules peu allongées, qui ressemblent donc à des levures, mais qui restent attachées les unes aux autres.

Le pseudomycélium se ramifie généralement, par formation de bourgeons latéraux, le plus souvent dans la zone subapicale des articles (figure 2).

Figure 2 : Le pseudomycélium de *Candida albicans* (culture de 24 heures à 28°C sur milieu "eau de riz glucosée").



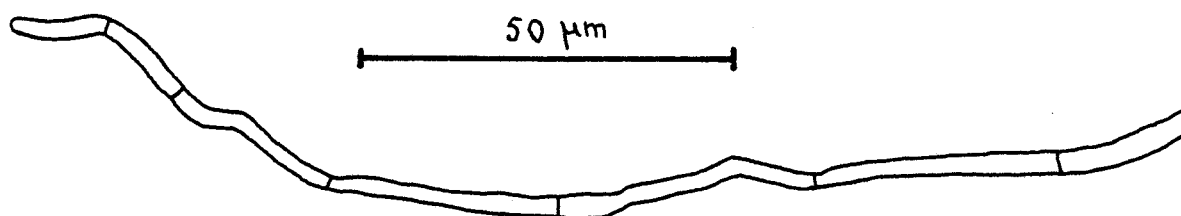
-le mycélium : cette forme se rencontre dans les tissus envahis par *Candida albicans* et il semble que ce soit la forme d'invasion des tissus (64). On peut l'obtenir en culture dans des milieux liquides ou gélosés. SHEPHERD et SULLIVAN (97) et nous-même (23) l'avons obtenu en culture continue dans des conditions différentes.

Comme le mycélium des Champignons filamenteux, celui de *Candida albicans* est formé de filaments qui s'allongent d'une manière continue (et non par bourgeonnement discontinu) ; le noyau se divise dans la zone



subapicale ; des cloisons se forment secondairement pour limiter les articles (83). A l'examen microscopique on n'observera pas de constriction au niveau des cloisons (figure 3). Comme le pseudomycélium, le mycélium peut être ramifié.

Figure 3 : Le mycélium de *Candida albicans* (culture de 24 heures à 37°C sur milieu "eau de riz glucosée").



-la chlamydospore : la production de chlamydospores est utilisée dans les laboratoires d'analyses médicales comme l'un des tests d'identification rapide de *Candida albicans*. En effet, seulement trois espèces de *Candida* très voisines les unes des autres : *C. albicans*, *C. stellatoidea* et *C. tropicalis* peuvent former des chlamydospores. Selon WINTER et FOLEY (123) et SAEZ et Coll. (89) *C. albicans* et *C. stellatoidea* seraient synonymes. Chez *C. tropicalis*, peu de souches forment des chlamydospores (120).

La chlamydospore de *C. albicans* est typiquement une production de thalles pseudomycéliens dans certaines conditions de culture. Nous sommes donc obligé de la décrire dans son contexte habituel et nous expliquerons ensuite pourquoi nous en faisons une forme de *C. albicans* au même titre que la levure, le pseudomycélium et le mycélium.

Nous décrivons la formation des chlamydospores dans le milieu "eau de riz glucosée". L'eau de riz glucosée est obtenue en portant à ébullition 10 g de crème de riz dans un litre d'eau déminéralisée, en recueillant le surnageant après centrifugation et en y ajoutant 0,25 g de glucose et en complétant à un litre avec de l'eau. Pour obtenir des chlamydospores, il faut ensemencher ce milieu, réparti à raison de 10 ml par fiole de Legroux, avec une quantité appropriée de levures ( $10^4$  levures/ml par exemple) et incubé à 28°C. Dans ces conditions, après 12 heures de culture, on obtient des thalles pseudomycéliens ; on observe alors que l'extrémité des articles pseudomycéliens terminaux se renfle légèrement et son contenu devient granuleux. Une heure plus tard cette extrémité s'est séparée du reste de l'article par une cloison. La cellule ainsi isolée continue de grossir et devient alors la protochlamydospore ou organe ampulliforme. Une heure plus tard la protochlamydospore a émis un bourgeon qui grossit et forme une cellule à contenu granuleux dont la paroi s'épaissit fortement, la chlamydospore. On peut reconstituer cette histoire à partir de l'observation de divers thalles d'une culture, le phénomène est relativement synchrone. On peut aussi essayer de suivre cette évolution sur un seul thalle en l'observant plusieurs fois de suite : pour cela nous avons déposé des gouttes de milieu gélosé contenant la suspension de levures sur des lames de microscope, nous avons recouvert ces gouttes d'une lamelle et commencé l'incubation en chambre humide. Mais la lumière est inhibitrice de la chlamydosporulation et l'examen répété des thalles sous le microscope n'a pas pu être mené jusqu'à l'observation de la chlamydospore. Nous avons essayé, sans succès, d'interposer un filtre rouge dans le dispositif d'éclairage ou d'utiliser la lumière produite par un tube fluorescent rouge (Sylvania XL F40). Notre échec s'explique par le choix suivant : ou bien on a suffisamment de lumière pour pouvoir observer et dessiner et dans ce cas les chlamydospores sont remplacées par un filament produit par la protochlamydospore ; ou bien les chlamydospores sont produites mais l'éclairage est trop faible pour pouvoir dessiner à la chambre claire. Nous n'avons donc pu illustrer que les premières étapes à partir d'un même thalle (figure 4).

Nous ferons deux remarques sur ces observations :

- 1) la protochlamydospore n'est pas produite par bourgeonnement, elle s'isole de l'article pseudomycélien qui la produit par une cloison, un peu à la manière du mycélium vrai ;

Figure 4 : Les premières étapes de la formation des chlamydo-spores chez *Candida albicans* (sur milieu eau de riz glucosée gélosée à 28°C).

- A : l'extrémité d'un article pseudomycélien se renfle  
 B : le renflement se sépare du reste de l'article par une cloison et forme l'organe ampulliforme ou protochlamydo-spore  
 C : émission de bourgeons. Le bourgeon  $b_1$  deviendra une chlamydo-spore, le bourgeon  $b_2$  peut en devenir une.

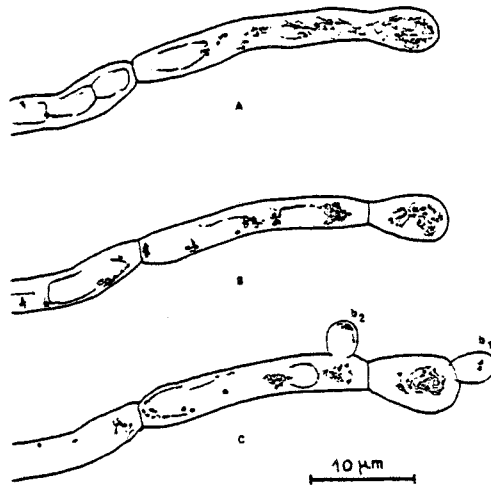
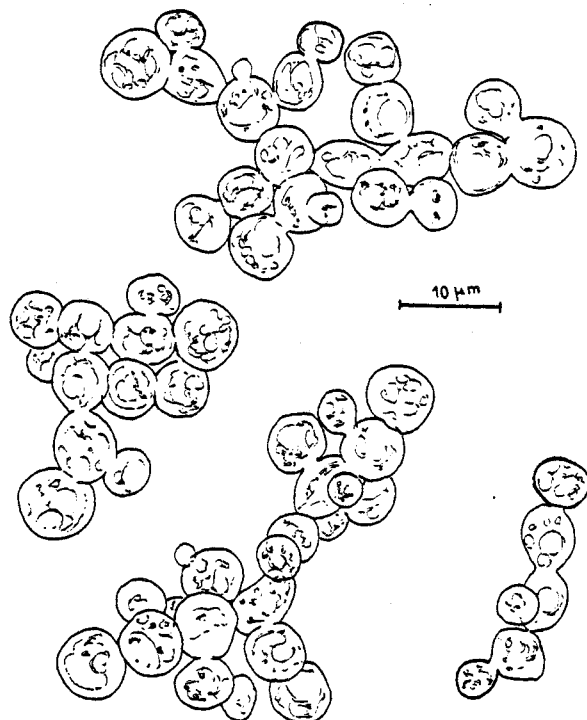


Figure 5 : Grappes de chlamydo-spores obtenues en culture continue.



2) sur notre dessin (figure 4) l'autre partie de cet article produit aussi un bourgeon ; on observe cela fréquemment, et ce bourgeon se transforme en chlamyospore lui aussi.

Dans d'autres conditions de culture, nous avons obtenu et décrit (26) des chaînes de 4 ou 5 cellules à contenu dense qui ressemblent aux chlamydospores. Nous avons rapproché notre observation de celle de DAWSON (17) qui indique que *Candida stellatoidea* forme des chlamydospores en chaîne sur milieu de Czapek-Dox. LODDER et KREGER VAN RIJ (59) montrent dans leur ouvrage de 1952 un dessin de telles chlamydospores produites sur milieu "pomme de terre-agar".

Enfin nous avons obtenu en culture continue des grappes de chlamydospores (figure 5) et c'est la raison pour laquelle nous parlons d'une forme "chlamyospore".

#### 1.2.2. MORPHOGENESE.

Voici donc présenté *Candida albicans* sous ses 4 aspects morphologiques possibles. Théoriquement, chaque forme pourrait être obtenue à partir de l'une quelconque des trois autres ce qui conduirait à 12 transformations possibles. Certaines de ces transformations sont très faciles à obtenir, d'autres réclament un ajustement plus précis des conditions de culture. Nous n'avons pas observé la transformation levure en chlamyospore, et, à notre connaissance, personne ne l'a obtenue. La transformation réciproque (chlamyospore en levure) nous pose un problème d'interprétation. Il y a donc au moins 10 transformations morphologiques possibles chez *Candida albicans* ; cette richesse nous semble intéressante à exploiter. Nous passerons ces transformations en revue, bien que notre travail concerne principalement la suite de transformation : de la levure au pseudomycélium, puis à la chlamyospore.

-la transformation en levure (figure 6) : le pseudomycélium bourgeonne facilement des levures lorsqu'il vieillit (dans l'eau de riz glucosée). Les levures apparaissent le plus souvent au niveau des noeuds du pseudomycélium, c'est à dire à la limite de deux articles. Dans un milieu liquide, on s'aperçoit du détachement de ces levures qui continuent à se multiplier par bourgeonnement.

Le mycélium, obtenu par exemple dans un milieu synthétique à 37°C, bourgeonne généralement des levures après 24 heures de culture. Assez souvent on peut voir les cicatrices de bourgeonnement sur le mycélium.

Figure 6 : La transformation en levure.

A : pseudomycélium  $\rightarrow$  levure ; B : mycélium  $\rightarrow$  levure.

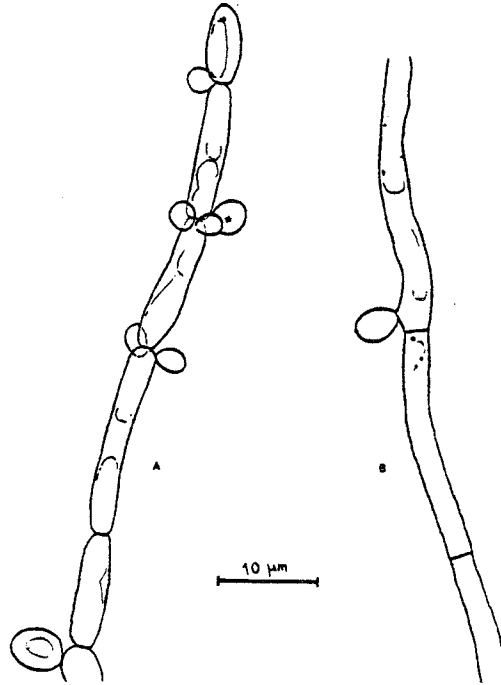
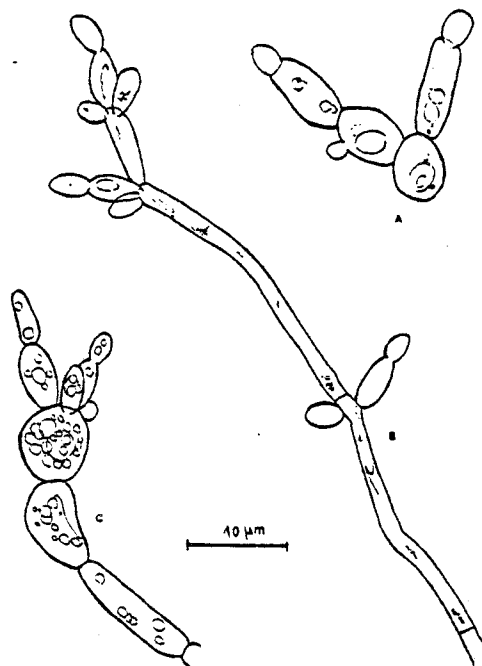


Figure 7 : La transformation en pseudomycélium.

A : levure  $\rightarrow$  pseudomycélium ; B : mycélium  $\rightarrow$  pseudomycélium ;  
C : chlamyospore  $\rightarrow$  pseudomycélium.



Les chlamydo-spores de *C. albicans* perdent rapidement, en moins de 24 heures, leur pouvoir de se développer (27, 49, 67). Lorsqu'on transfère des thalles porteurs de jeunes chlamydo-spores (âgées de quelques heures) dans du milieu de Sabouraud (glucose 20 g, néopeptone Difco 10 g, eau déminéralisée 1000 ml) et que l'on continue l'incubation à 28°C, on observe le bourgeonnement des chlamydo-spores. Celles-ci produisent une chaîne de grosses cellules en tonnelet que nous ne pouvons pas classer dans l'une des 4 formes décrites précédemment. Nous n'avons jamais observé la production de véritables levures par les chlamydo-spores.

-la transformation en pseudomycélium (figure 7) : la levure produit du pseudomycélium dans l'eau de riz glucosée à 28°C, avons-nous dit. Dans ces conditions, la levure émet un bourgeon allongé qui ne se détache pas de la levure. Puis l'article pseudomycélien et la levure bourgeonnent à nouveau, de manière à peu près synchrone, et forment chacun un nouvel article pseudomycélien. Le temps de génération est d'environ 2 heures.

Le pseudomycélium apparaît aussi dans les cultures levuriformes âgées sur milieu de Sabouraud gélosé. Nous avons mentionné que le mycélium obtenu en milieu synthétique à 37°C bourgeonne des levures. Dans ces mêmes cultures âgées on peut observer la formation de pseudomycélium à partir du mycélium.

Les jeunes chlamydo-spores (âgées de quelques heures) transférées dans certains milieux neufs peuvent bourgeonner des articles pseudomycéliens (JANSONS et NICKERSON (49)). Nous avons observé la même transformation dans des cultures en milieu synthétique liquide, sans transfert.

-la transformation en mycélium (figure 8) : la transformation de la levure en mycélium est utilisée comme test d'identification rapide de *Candida albicans* (test de blastèse) (63, 111). A cet effet on inocule la levure dans du sérum (généralement du sérum de cheval) et on incube à 37°C pendant 3 heures. La levure émet alors un tube germinatif qui sort de la levure sans former de constriction. Ce tube germinatif est flexueux. Si la culture est agitée, les tubes germinatifs s'agglutinent. LOURIA et Coll. (61) ont émis l'hypothèse d'une substance agglutinante dans le sérum qu'ils pensent même avoir isolée (102). Malheureusement d'autres auteurs (65, 98) indiquent que ce phénomène

Figure 8 : La transformation en mycélium (formation de tubes germinatifs).

A : chlamyospore → mycélium ; B : levure → mycélium (blastèse) ;  
C : pseudomycélium → mycélium (la flèche montre l'absence de constriction).

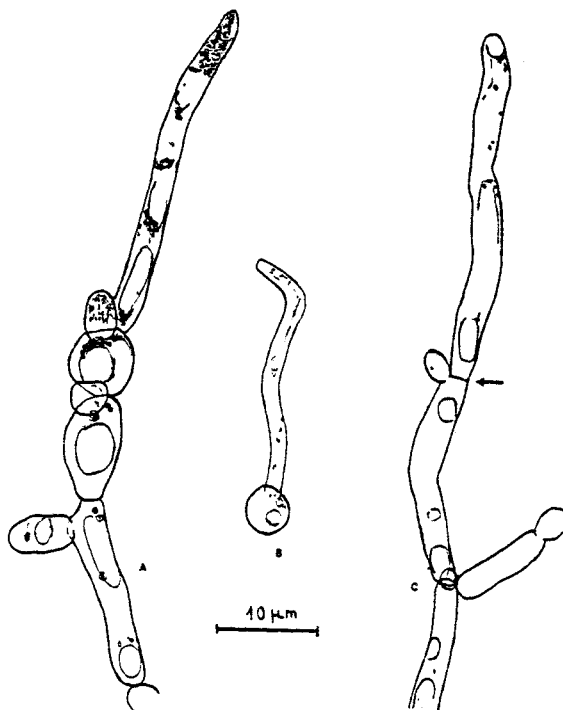
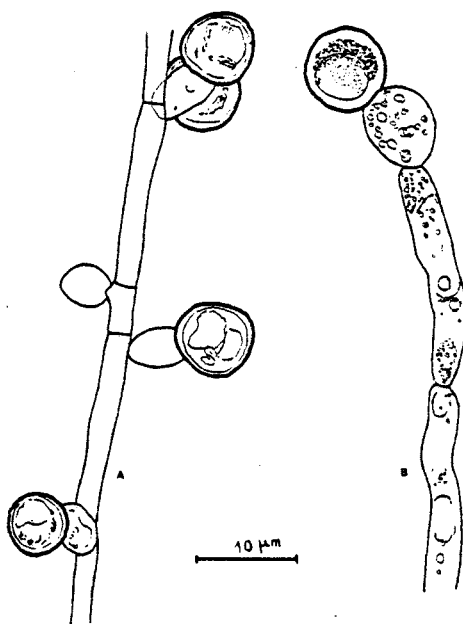


Figure 9 : La transformation en chlamyospore.

A : mycélium → chlamyospore ; B : pseudomycélium → chlamyospore.



d'agglutination se produit en milieu synthétique. Ce serait donc une propriété des tubes germinatifs eux-mêmes.

Quoi qu'il en soit, ces tubes germinatifs continuent leur croissance à la manière du mycélium. Nous montrons sur la figure 8 des tubes germinatifs obtenus en eau de riz glucosée à 37°C.

De nombreux mycologues médicaux pensent que la transformation levure → mycélium est la première étape que franchit *Candida albicans* lorsqu'il devient pathogène. C'est une raison d'étude supplémentaire (la première étant le test d'identification). La littérature est très abondante sur ce sujet.

Le pseudomycélium et la jeune chlamyospore transférés à 37°C dans un milieu approprié (eau de riz glucosée ou milieu pour culture cellulaire TC 199 par exemple) émettent eux aussi des tubes germinatifs et du mycélium (WALBAUM et DUJARDIN) (119).

-la transformation en chlamyospore (figure 9) : c'est le deuxième test utilisé pour l'identification rapide de *Candida albicans* : on pratique ce test en ensemençant des levures sur des milieux gélosés appropriés (il existe de très nombreuses recettes) ; dans les techniques classiques il est conseillé de recouvrir l'inoculum d'une lamelle pour créer une semi-anaérobiose. Après 24 heures d'incubation à 28°C, les levures ont formé du pseudomycélium qui, lui-même, a produit des chlamyospores. Nous n'avons jamais observé la production de chlamyospores, directement à partir de levures.

Il est rare également d'obtenir des chlamyospores sur du mycélium vrai : nous avons cependant observé, dans un fermenteur, du mycélium accroché sur les parois et porteur de chlamyospores.

### I.3. NOTRE ATTITUDE FACE A CES FAITS

Notre manière de regarder *Candida albicans* et ses transformations morphologiques est fortement influencée par la lecture de "Modèles mathématiques de la morphogenèse" de THOM (112). Dans certains de ses écrits, THOM compare les activités de recherche à un jeu (au chapitre 17 de l'ouvrage



précédent par exemple). Nous apprécions cette manière de voir, même si cela peut paraître déplaisant aux joueurs trop sérieux !.

Le système que nous étudions peut être comparé à une "boîte noire" c'est à dire une boîte à parois opaques ; on ne peut pas en connaître le contenu. Cependant cette boîte est munie de commandes d'entrées que l'on peut manipuler et elle répond par une sortie que l'on peut observer.

Dans le système qui nous préoccupe, nous pouvons identifier dans un premier temps les entrées avec les conditions de culture et les sorties avec la morphologie qu'adopte *Candida albicans* en réponse à ces entrées. Le but de la recherche est de "dévoiler la boîte noire" c'est à dire de comprendre comment elle fonctionne, "le seul moyen de dévoiler une boîte noire, c'est de jouer avec" (112).

Une première étape de la connaissance consistera donc, à l'aide d'essais successifs, à dresser un catalogue indiquant les entrées essayées et les sorties correspondantes. Il est possible d'observer plusieurs sorties différentes pour une même entrée, car généralement l'histoire passée du système intervient dans la valeur de la sortie.

Un tel catalogue pourra être très utile et pourra être consulté par ceux qui désirent obtenir une certaine sortie. Ainsi, si nous revenons à *Candida albicans*, on pourra sélectionner dans le catalogue des conditions favorables à telle ou telle transformation.

Mais ce catalogue peut être allongé presque indéfiniment ; en effet les paramètres à l'entrée sont nombreux et on peut leur faire prendre un grand nombre de valeurs. Au lieu de rendre service, un tel catalogue trop long ne fait plus qu'embrouiller les idées et présente souvent des conditions apparemment contradictoires : ainsi ODDS (73) a dressé une liste des facteurs favorisant la formation du mycélium de *Candida albicans* en relevant ce qui est noté dans la littérature ; on y trouve par exemple  $\text{pH} > 7,0$  selon 8 références bibliographiques et  $\text{pH} < 7,0$  selon trois autres. Cette contradiction n'est qu'apparente, car les auteurs n'ont pas travaillé dans les mêmes conditions. Il est souvent difficile de dégager des règles générales après ce type d'étude.

Il sera donc nécessaire de se consacrer à une tâche d'interprétation qui essayera de savoir comment la boîte noire fonctionne. Une méthode très souvent utilisée est la méthode réductionniste, analytique : "elle consiste à casser la boîte noire pour voir ce qu'il y a dedans". Bien souvent cette méthode procure d'autres boîtes noires, des sous-systèmes et l'on recommence à dresser de nouveaux catalogues ; il faut de plus décrire, si cela est possible, les interactions entre les sous-systèmes obtenus. Très souvent cette méthode ne renseigne pas sur le fonctionnement du système initial.

Une autre voie consiste à faire des hypothèses sur le système et à faire appel à une théorie. Nous exposerons cette démarche appliquée à la morphogenèse de *Candida albicans* dans notre troisième chapitre. Auparavant nous présenterons le catalogue des conditions de la chlamydosporulation. Il s'agit d'une étude physiologique classique d'un phénomène peu étudié jusqu'alors.

## II. ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA CHLAMYDOSPORULATION DE CANDIDA ALBICANS

### II.1 INTRODUCTION

#### 2.1.1. BREVE REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.

Comme le fait remarquer ODDS (73), peu de travaux ont été consacrés à la formation des chlamydospores de *Candida albicans* si on prend comme référence la masse des publications relatives à la transformation levure - mycélium du même microorganisme.

La plupart des recherches consacrées à la chlamydosporulation chez *C. albicans* ont eu pour objectif la détermination rapide de l'espèce et les auteurs se sont intéressés tout naturellement à la fréquence d'apparition du phénomène : ils déterminent le pourcentage de souches produisant des chlamydospores dans un délai fixé d'avance (généralement 24 ou 48 heures). Ils sont amenés ainsi à comparer différents milieux (15, 28, 34, 80, 128 par exemple) ; d'autres auteurs, comme HAYES (46), complètent cette notion de fréquence en tenant compte de l'abondance de la production. De rares travaux, plus physiologiques, ceux de l'école de NICKERSON (49, 71, 72) ou ceux de FEO (31, 32), ne retiennent que cette notion d'abondance.

De nombreux travaux ont été consacrés à la formulation d'un milieu de culture efficace. Un grand nombre de milieux naturels a été proposé : les plus utilisés contiennent de la farine de maïs (10, 39, 80), un extrait de pomme de terre et de carotte (76, 77) ou des extraits de riz ou de crème de riz (108, 109, 110).

Certains auteurs ont proposé des milieux au sérum humain (29), au blanc d'oeuf (12), ou à l'extrait de terre (5). Le lait de vache dilué constitue un excellent milieu selon FEO et DE PACHECO (32).

Selon REID et Coll. (85) l'utilisation de la zéine à la place de la farine de maïs entière augmente la production des chlamydospores.

De nombreux auteurs complètent leur milieu avec un agent tensio-actif : tween 80, bile de boeuf ou taurocholate de sodium (4, 6, 34, 40, 77, 86, 110).

NICKERSON et MANKOWSKI (71) ont proposé un milieu semi-synthétique qui est commercialisé et souvent utilisé.

Il existe également des formules de milieux synthétiques (66, 100, 124) et Mc CLARY (62) signale la formation de chlamydospores de *C. albicans* sur le milieu de culture synthétique qu'il a étudié.

Le milieu gélosé proposé par MEINHOF et Coll. (66) contient du cholestérol, du tween 80 et de l' $\alpha$ -méthyl glucoside. Ce sont des constituants peu communs dans les milieux de culture pour Champignons. Certains auteurs se sont en effet tournés vers la recherche des substances qui induiraient plus ou moins spécifiquement la formation des chlamydospores de *C. albicans*. Les agents tensio-actifs sont généralement considérés selon ce point de vue. STRIPPOLI et SIMONETTI (107) ont obtenu des chlamydospores dans une simple solution de N-acétyl-D-glucosamine. Dans cette même solution ils obtiennent des tubes germinatifs après 2 heures d'incubation à 37°C puis des chlamydospores après 48 heures à 26°C. Ils en concluent, hâtivement selon nous, que la N-acétyl-D-glucosamine est la substance clé du dimorphisme et des variations morphologiques de *Candida albicans*. GUNASEKARAN et HUGHES (43, 44) proposent un milieu contenant du "chitosan" (glucosamino-glucane N déacétylé).

La température d'incubation des cultures se situe généralement entre 25°C et 30°C (53) et BAKERSPIGEL (6) ne réussit pas à produire les chlamydospores à 37°C en reprenant les conditions indiquées par ASCHNER (4).

SUKROONGREUNG (108) a étudié l'influence du pH sur la chlamydo-  
sporulation, sur un milieu au riz. Selon lui, les pH compris entre 2,2 et  
11,9 sont favorables avec un optimum pour les pH compris entre 6,6 et 8,0.

Il est généralement conseillé, sur milieu gélosé, de recouvrir  
l'inoculum à l'aide d'une lamelle (54, 114) ou d'ensemencer en profondeur dans  
la gélose (108) ; une "semi-anaérobiose" serait favorable à la chlamydo-  
sporulation.

Un autre facteur, la densité d'ensemencement (17, 49, 114), a été  
signalé, mais il est généralement négligé dans les laboratoires d'analyses  
médicales. GRIFFITHS (41) omet d'en parler dans sa revue. Nous montrerons ul-  
térieurement que, selon nous, ce facteur est très important.

Pour terminer cette courte revue bibliographique, rappelons que  
la lumière inhibe la formation des chlamydo-spores (1, 2). SALTARELLI et  
COPPOLA (90) n'observent pas cet effet, mais ils ont utilisé pour leur étude  
des énergies lumineuses faibles, très inférieures à celles indiquées par  
ANDRIEU et Coll. (1).

Partant de ces connaissances, nous nous sommes engagé dans notre  
étude de la chlamydo-sporulation avec les principes suivants :

#### 2.1.2. NOTRE BUT, NOS PRINCIPES.

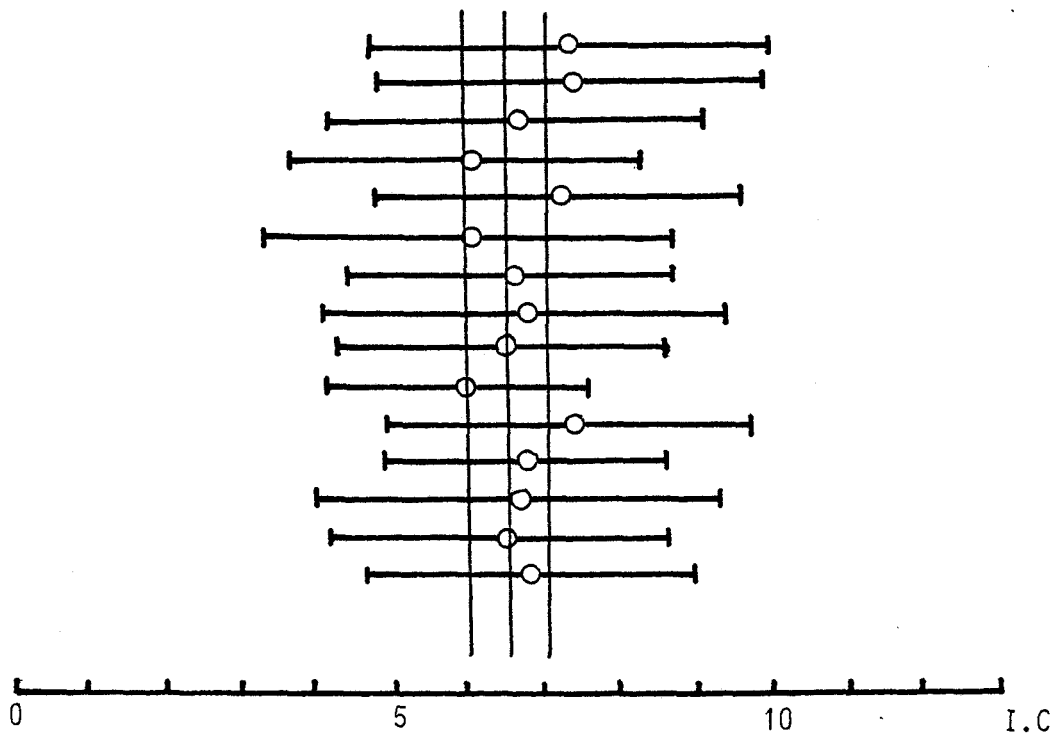
Notre but était de trouver les conditions favorables à la produc-  
tion des chlamydo-spores de *Candida albicans*, les conditions dans lesquelles  
on obtient une grande quantité de chlamydo-spores. C'est donc la notion d'abon-  
dance et non de fréquence que nous avons retenue. Par conséquent, nous avons  
décidé de n'utiliser qu'une seule souche de *C. albicans* et pour plus de sé-  
curité nous avons réalisé un isolement à partir d'une seule levure. La souche  
nous a été fournie par le Centre Hospitalier Universitaire de Lille où elle  
portait le numéro de référence 6311. Elle provient d'un liquide d'hémodialyse  
et a été isolée le 31 Août 1976. Parmi les clones que nous avons préparés,  
immédiatement après l'isolement, nous avons retenu le clone 5. Ce clone a été  
conservé sur milieu de Sabouraud, repiqué périodiquement. A chaque repiquage  
il est cultivé durant 24 heures à 37°C puis conservé à la température du la-  
boratoire. Il a été nécessaire trois ou quatre fois de procéder à de nouveaux

isolements mono-levure car le clone d'origine perdait certains de ses caractères morphologiques d'origine (devenait "rough" ou produisait moins de chlamydo-spores).

Pour apprécier l'abondance de la production de chlamydo-spores, nous avons utilisé un indice de chlamydo-sporation : un tel indice a été proposé par ANDRIEU et Coll. (1, 2). Nous en donnons la définition suivante : c'est le nombre moyen de chlamydo-spores produites par un thalle pseudomycélien issu d'une levure ensemencée. Un thalle est une entité spatiotemporelle naturelle puisqu'il correspond au développement, dans des conditions que l'on peut bien préciser, d'une seule cellule. La moyenne du nombre de chlamydo-spores est effectuée à partir de 30 mesures ; nous avons vérifié à plusieurs reprises que l'on obtient autant de thalles pseudomycéliens que de levures ensemencées. Pour montrer la valeur de cet indice de chlamydo-sporation voici les résultats de 15 déterminations obtenues à partir de 15 fioles ensemencées le même jour dans des conditions identiques : la figure 10 indique pour chaque fiole la moyenne des 30 mesures (l'indice de chlamydo-sporation)  $\pm$  l'écart-type. Pour chaque fiole, on remarque une assez grande dispersion autour de la moyenne. Nous verrons ultérieurement que les chlamydo-spores apparaissent de manière à peu près synchrone sur les thalles qui se sont développés de manière non synchrone, donc sur des thalles plus ou moins grands. Les grands thalles portent davantage de chlamydo-spores que les petits.

Par contre si nous faisons la moyenne des indices de chlamydo-sporation, nous trouvons 6,67 chlamydo-spores/thalle et un écart-type de 0,49 chlamydo-spores/thalle. La dispersion autour de la moyenne est faible et la mesure de l'indice de chlamydo-sporation, telle que nous la faisons, permet d'apprécier valablement l'abondance de la production de chlamydo-spores.

Figure 10 : L'indice de chlamydosporulation (I.C.) : c'est le nombre moyen de chlamydospores produites par un thalle issu d'une levure ensemencée. La figure présente la détermination des I.C. dans 15 fioles ensemencées dans les mêmes conditions (0 = I.C. ; le trait représente  $\pm$  l'écart-type. Les lignes verticales représentent la moyenne des I.C.  $\pm$  l'écart-type).



En ce qui concerne les milieux de culture, nous avons décidé qu'ils seraient "ordinaires" c'est à dire semblables aux milieux mycologiques habituels, dépourvus de substances exceptionnelles comme le tween 80 ou la N-acétyl-D-glucosamine. L'origine de cette décision est la remarque que les chlamydospores de *Candida albicans* sont toujours produites par du pseudomycélium (ou du mycélium) mais jamais directement par une levure et nous avons émis l'hypothèse que, à partir des levures ensemencées, une première phase de croissance pseudomycélienne était indispensable, et que l'induction consécutive de chlamydospores dépendait non de l'apport dans le milieu de culture d'une substance particulière, mais du judicieux équilibre de ses composants banals : sources de carbone et d'azote, sels minéraux, vitamines éventuellement.

Nous avons également décidé de travailler en milieu liquide pour deux raisons : tout d'abord pour permettre la récolte des thalles et faciliter

ainsi certaines études, ensuite pour éviter l'apport d'impuretés par l'agar lorsque nous aborderions l'étude de milieux synthétiques seuls capables de répondre à nos interrogations.

La question s'est ensuite posée de savoir comment réaliser en milieu liquide cette semi-anaérobiose qui, selon la littérature, est très favorisante sinon indispensable. Nous avons rapidement résolu cette difficulté en constatant dans nos premiers essais que cette condition d'anaérobiose n'était pas indispensable. Par conséquent, nous ferons nos cultures en fioles sans conditions particulières ; le problème mérite cependant une étude que nous décrirons plus tard.

Nous avons enfin décidé d'incuber nos cultures à 28°C, température habituellement utilisée dans les laboratoires d'analyses médicales pour la production de ces chlamydospores et qui nous a donné satisfaction lors des premiers essais.

Selon nous, il fallait commencer cette étude physiologique par celle du milieu de culture.

## II.2 ETUDE DU MILIEU DE CULTURE

### 2.2.1. APPROCHE EN MILIEU DE CULTURE NATUREL.

Selon les principes énoncés plus haut, pour définir la composition d'un milieu synthétique permettant une abondante chlamydosporulation, il faut trouver l'équilibre de ses constituants. Cependant, n'ayant aucune information de départ sur la nature d'un tel équilibre, nous avons choisi un milieu de culture naturel favorable que nous avons progressivement enrichi à l'aide de composés chimiques connus jusqu'à rompre l'équilibre initial. Notre choix d'un milieu naturel a été guidé par l'expérience personnelle de S. ANDRIEU qui utilise avec satisfaction le riz-agar-tween (R.A.T.) selon la formule de TASCHDJIAN (110). Nous avons supprimé de la formule l'agar et le tween conformément à nos principes ; le milieu de base choisi devenait donc la simple décoction de crème de riz.



2.2.1.1) influence de la concentration de glucose et de la densité d'ensemencement : le premier composé que nous avons utilisé pour déséquilibrer notre milieu de base est le glucose, qui est indiqué par presque tous les auteurs comme un inhibiteur de la production des chlamydo-spores, même à faible concentration. Dès nos premiers essais, nous avons remarqué que la densité d'ensemencement est un facteur important et les premières expériences ont été réalisées avec différentes densités d'ensemencement.

Nous avons publié les résultats préliminaires suivants (18) :

.précultures : les levures servant d'inoculum pour les milieux de sporulation sont obtenues par culture dans un milieu synthétique liquide dont la composition est la suivante :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 1,5 g ;  $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,5 g ;  $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$  : 0,15 g ;  $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,020g ;  $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$  : 0,010 g ;  $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$  : 0,015 g ; Glucose : 20 g ; Sérine : 11,2 g ; Thiamine : 100 µg ; Biotine : 5 µg ; eau distillée : 1000 ml. Deux cultures successives sont effectuées dans des tubes de 18 x 180 mm contenant environ 10 ml de milieu ; ces cultures sont conduites à 28°C à l'obscurité et durent 72 heures pour la première, 48 heures pour la seconde.

.milieux de sporulation : nous avons utilisé de l'eau de riz préparée de la manière suivante : 10 g de crème de riz sont mis en suspension dans 1000 ml d'eau déminéralisée froide ; le tout est porté à ébullition qui est maintenue durant 30 secondes. La décoction est filtrée sur coton, puis centrifugée à 2500 g durant 20 minutes. Le surnageant est complété à 1000 ml avec de l'eau déminéralisée : nous l'appellerons "eau de riz".

Les milieux de sporulation contenant différentes quantités de glucose sont réalisés en ajoutant 8 g de glucose pur à 900 ml d'eau de riz, ce qui donnera après ensemencement une concentration de 8 g/l. Une série de dilutions au 1/2 dans de l'eau de riz permet d'obtenir les concentrations finales en glucose de 4, 2, 1, etc... g/l. La concentration en glucose de l'eau de riz elle-même est faible, inférieure à 0,1 g/l et a été négligée pour l'expression des résultats.

Les milieux de sporulation sont répartis, après stérilisation à l'autoclave (110°C, 20 minutes), à raison de 9 ml/fiole de Legroux.

.préparation de l'inoculum : les tubes de préculture sont agités et la suspension de levures est centrifugée à 2200 g pendant 15 minutes. Le culot est remis en suspension dans de l'eau déminéralisée et centrifugé à

nouveau ; cette opération de lavage est répétée 3 fois de suite. Le dernier culot est remis en suspension dans de l'eau de riz. Avec cette dernière suspension, on réalise une série de dilutions où les levures sont à une concentration 10 fois supérieure à la concentration finale des milieux de sporulation.

.ensemencement : les fioles de Legroux contenant déjà 9 ml de milieu de sporulation reçoivent chacun 1 ml de l'inoculum approprié, afin d'obtenir les concentrations de glucose et les densités d'ensemencement indiquées dans le tableau de résultats. Les cultures sont alors placées à 28°C, à l'obscurité pendant 24 heures. Après ce délai, les fioles sont légèrement agitées et on prélève dans chacune d'elles une goutte qui est étalée entre lame et lamelle. On détermine alors au microscope l'indice de chlamydosporulation.

.résultats : les résultats sont indiqués dans le tableau 1, sur lequel nous avons tracé, pour en faciliter la lecture, des lignes d'égale sporulation. Nous remarquons ainsi que les résultats s'organisent en auréoles concentriques et qu'il existe une concentration de glucose et une densité d'ensemencement optimales ; dans les conditions d'expérience que nous avons choisies, ces optimums sont respectivement de 0,25 g/l et de 1000 levures par ml.

Cette publication avait pour but, principalement, de montrer qu'il était possible de réaliser une étude physiologique de la chlamydosporulation de *Candida albicans* en milieu liquide en utilisant un critère quantitatif : l'indice de chlamydosporulation.

Lorsque nous avons poursuivi notre travail en déséquilibrant l'eau de riz avec d'autres substances, nous avons modifié notre système de préculture comme suit (25) :

Nous avons remplacé le milieu de culture synthétique par du milieu de Sabouraud (glucose 20 g/l, peptone 10 g/l) liquide et nous avons effectué 2 cultures successives de 24 heures à 37°C dans des flacons de 8 cm de diamètre intérieur contenant 50 ml de milieu et inoculés à l'aide de  $5 \times 10^5$  levures. Les cultures étaient réalisées dans un bain-marie où elles étaient agitées (1 mouvement par seconde).

Les autres conditions n'ont pas été modifiées. Ce simple changement des conditions de préculture dérange l'organisation du tableau de résultats (tableau 2). On obtient encore une répartition en auréoles autour d'un optimum,

Tableau 1 : Indices de chlamydosporulation de *Candida albicans* après 24 heures de culture dans de l'eau de riz glucosée additionnée de différentes quantités de glucose en fonction de la densité d'ensemencement.

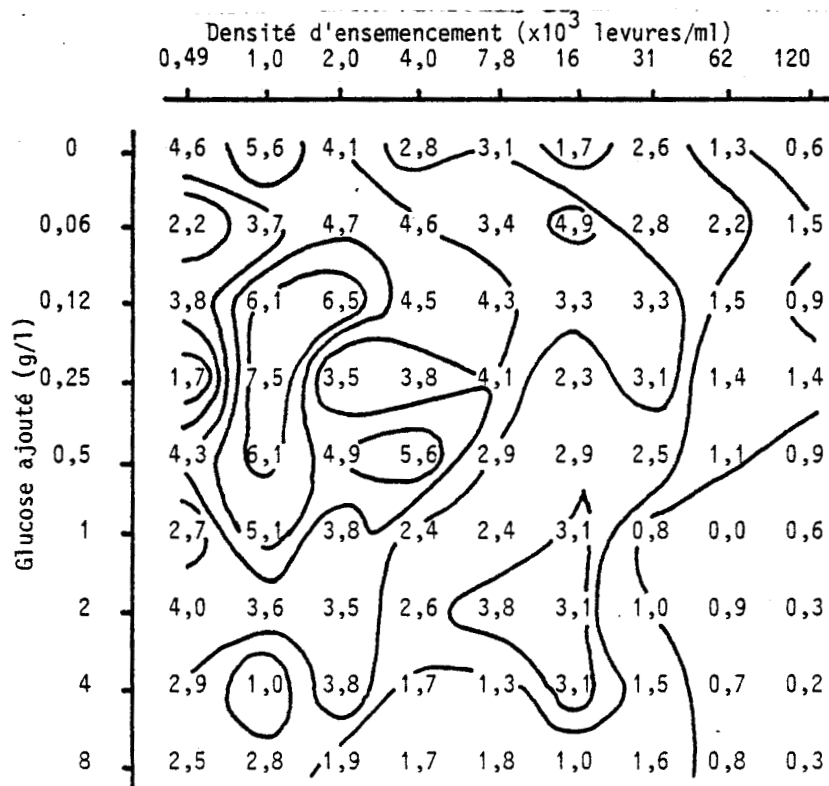
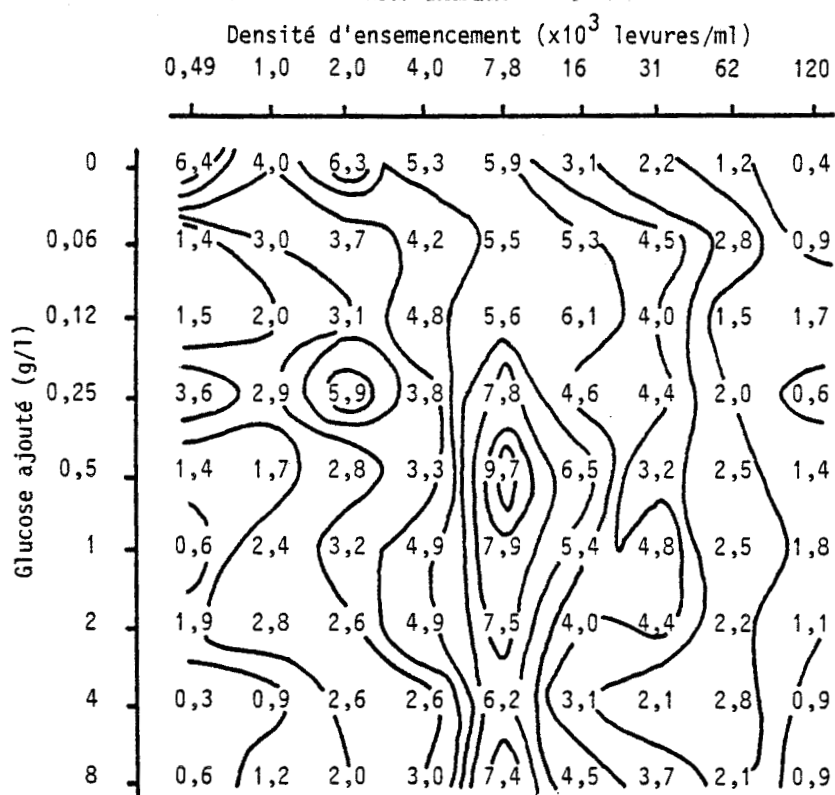


Tableau 2 : Indices de chlamydosporulation de *Candida albicans* après 24 heures de culture dans de l'eau de riz additionnée de différentes quantités de glucose en fonction de la densité d'ensemencement.



BUS  
LILLE

mais cet optimum s'est déplacé, de plus les auréoles se sont déformées, étirées : l'influence de la densité d'ensemencement devient plus importante que celle de la concentration de glucose. Avec les densités d'ensemencement supérieures ou égales à  $10^5$  levures/ml, aucune chlamydospore n'est observée.

Nous n'avons retenu de ces tableaux que les grandes tendances du "relief". Dans le détail, celui-ci est plus tourmenté, en particulier une section le long de la colonne correspondant à la densité d'ensemencement de 490 levures/ml, dans le tableau 2, ne montre pas un unique maximum. La répétition des expériences (tableaux 6 et 7 plus loin) confirmera l'ensemble des observations à savoir une organisation générale autour d'un optimum, et des variations dans les détails surtout lorsqu'on s'éloigne de l'optimum. A notre avis ces résultats doivent nous inciter à explorer l'espace des conditions initiales de culture par plans successifs plutôt que d'étudier l'influence d'un seul facteur à la fois.

Nous reviendrons dans le paragraphe 2.2.1.6 sur l'effet des conditions de précultures ; pour l'instant donnons quelques conclusions provisoires sur l'influence du glucose et de la densité d'ensemencement.

Les tableaux 1 et 2 montrent que la concentration de glucose initiale dans le milieu permet une plus ou moins grande production de chlamydospores après 24 heures de culture ; cet effet est plus important dans le tableau 1. La répétition des expériences (voir tableaux 6 et 7) nous a montré la réalité de cette différence et confirme l'influence des conditions de préculture.

Les différents facteurs qui interviennent dans le phénomène morphogénétique sont dépendants les uns des autres et les conclusions que nous pouvons tirer sont toujours assorties de la restriction "dans nos conditions expérimentales". C'est une limitation importante que les auteurs de revues négligent très fréquemment et qui les amène à citer des faits apparemment contradictoires. Rares sont ceux qui essaient de trouver la cause de ces contradictions. La tâche est d'ailleurs souvent difficile, car trop de petites différences existent entre les expériences des uns et des autres.

Nous pouvons dire que la concentration de glucose du milieu intervient dans la production des chlamydospores de *C. albicans*, mais des concentrations relativement importantes (8 g/l) ne sont pas inhibitrices "dans certaines conditions" (tableau 2, densité d'ensemencement  $7,8 \times 10^3$  levures/ml par exemple). Si on compare notre résultat à celui de WOLIN et Coll. (124) qui trouvent que 1 g

de glucose par litre est complètement inhibiteur de la formation des chlamydo-spores, on notera une contradiction. Nous avons réussi "dans d'autres condi-tions" que nous décrirons plus loin, l'obtention de chlamydo-spores en présence de 100 g de glucose par litre.

L'influence de la densité d'ensemencement est également manifeste. Nous en re-parlerons très souvent, en relation avec l'interdépendance des facteurs. Il nous semble étonnant que peu d'auteurs aient signalé cette importance (17) 49, 114). Mais il faut remarquer que la plupart des travaux sont réalisés en milieu gélosé où la densité d'ensemencement intervient peut-être différemment à cause de la diffusion des substances dans le gel, mais surtout parce que ces milieux sont généralement ensemencés de manière non homogène, en stries. Certains observateurs (qui ne sont pas d'accord entre eux) remarquent que les chlamydo-spores apparaissent dans le milieu de la strie ou au contraire sur les bords de celle-ci (6, 4). On peut considérer que le bord d'une strie cor-respond à une densité cellulaire moindre que son milieu, car il est en contact avec une partie non ensemencée.

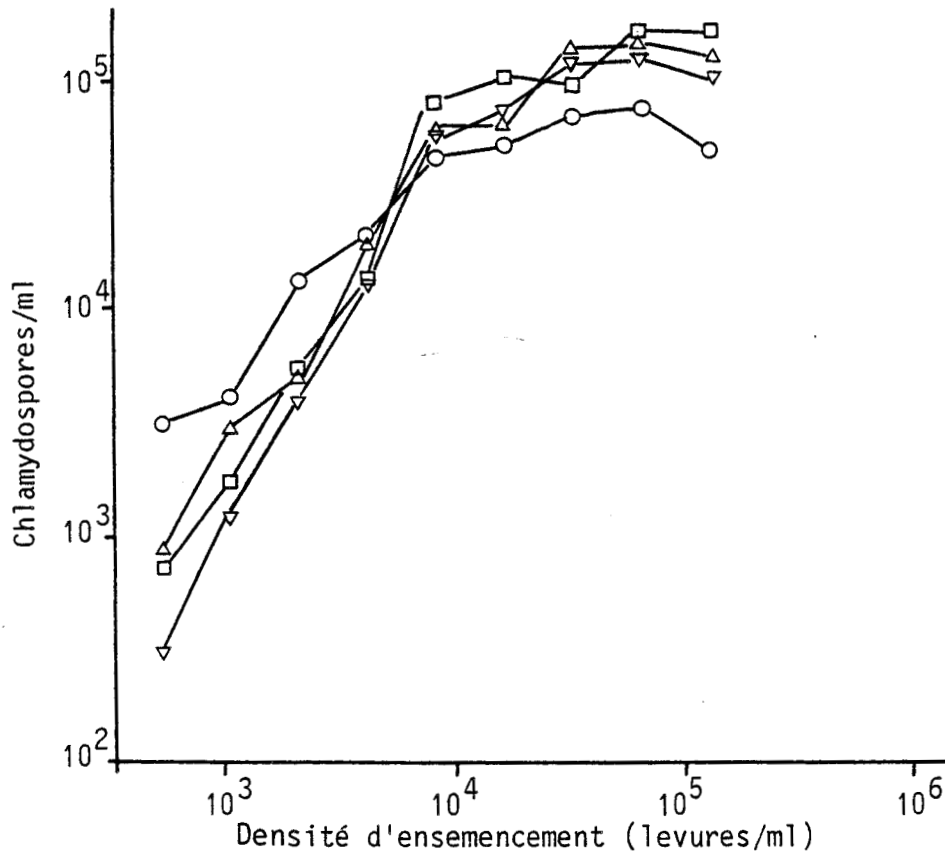
Dans notre publication (25), nous avons écrit "... nous émettons l'hypothèse que le fléchissement de l'indice de chlamydo-sporeulation concomitant de la densité de l'inoculum s'explique par un épuisement trop rapide du milieu de culture. Nous avons remarqué, en effet, que le thalle issu de chaque levure est d'autant moins développé que le nombre de levures ensemencées a été plus grand. Cette faible croissance de microcolonies ne permet pas la formation de multiples chlamydo-spores ; cela se traduit, sur les courbes indiquant le nombre de chlamydo-spores par unité de volume en fonction de la densité d'ensemencement, par une inflexion correspondant à  $7,8 \times 10^3$  blastospores/ml".

Ces courbes sont reproduites ici dans la figure 11. Notons que le nombre de chlamydo-spores/ml est obtenu en multipliant l'indice de chlamydo-sporeulation par la densité d'ensemencement et non par une détermination directe. Dans le texte cité, nous avons employé le mot "blastospore" ; nous avons préféré utiliser dans ce mémoire le mot "levure".

Le texte ci-dessus est une tentative d'explication du plateau des courbes de la figure 11. Notons que ce plateau s'interrompt brutalement à la densité d'en-semencement  $5 \times 10^5$  levures/ml (non visible sur la figure). Nous constatons simplement dans ce texte que si les indices de chlamydo-sporeulation diminuent lorsque les densités d'ensemencement augmentent au-delà de  $7,8 \times 10^3$  levures/ml, le nombre de chlamydo-spores/ml est constant. Nous établissons une relation

hypothétique entre ce fait et l'épuisement du milieu de culture. Mais nous ne donnons aucune explication pour ce point situé à l'abscisse  $7,8 \times 10^3$  levures/ml. Pourquoi n'observe-t-on pas un plateau depuis les plus faibles densités d'ensemencement ? Nous examinerons de nouveau ces courbes et en donnerons une description dans le cadre de la théorie des catastrophes (paragraphe 3.2.2.1).

Figure 11 : Nombre de chlamydospores produites par unité de volume en fonction de la densité d'ensemencement chez *C. albicans* après 24 heures de culture dans de l'eau de riz additionnée de glucose.

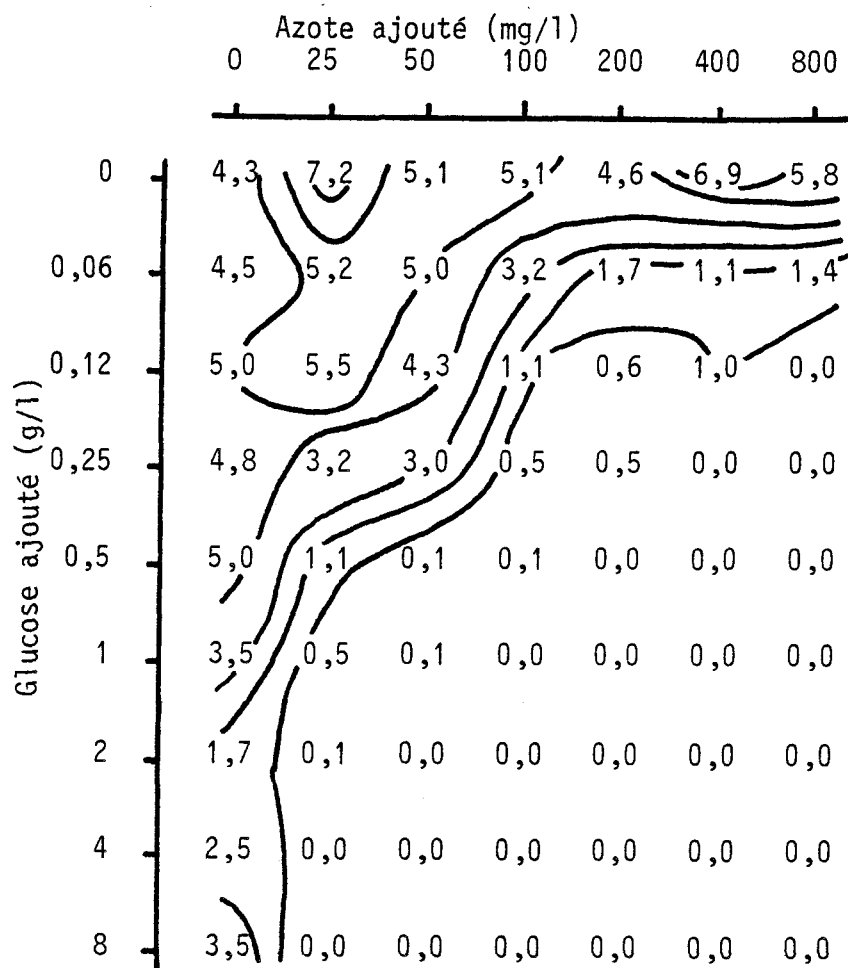


○ = 0 g/l ; □ = 0,5 g/l, △ = 2 g/l ; ▽ = 8 g/l.

2.2.1.2) influence de la concentration de glucose et de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  : la suite de cette étude (influence de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , biotine, autres sels minéraux) a été réalisée avec des précultures en milieu de Sabouraud liquide comme ci-dessus. La densité d'ensemencement est de  $10^4$  levures/ml.

Le tableau 3 montre l'influence combinée de la concentration de glucose et de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ajoutés à l'eau de riz. Les concentrations de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ont été traduites en concentration d'azote. D'après ces résultats, des chlamydospores sont produites si l'un au moins des deux composés ajoutés s'y trouve à une faible concentration. L'association d'une concentration relativement forte de glucose et d'azote (par exemple 1 g/l et 50 mg/l, respectivement) inhibe la chlamydo sporulation et favorise au contraire la croissance : dans ce cas nous avons observé un développement important de pseudomycélium, des chaînes de protochlamydospores ainsi que des levures. Il nous avait semblé, à l'époque où ce travail a été réalisé, que la production des chlamydospores était liée à une certaine limitation de la croissance : on pouvait ajouter à l'eau de riz une forte concentration de glucose car l'azote restait limitant ou inversement ajouter une forte concentration d'azote car le carbone restait limitant. La production des chlamydospores était le but de notre travail ; la production de chaînes de protochlamydospores représentait un échec de la culture. Nous pensons maintenant différemment : à un certain moment de la culture, il se produit un changement morphologique ; la multiplication des cellules ne se fait plus sous forme d'articles pseudomycéliens mais sous forme de ce que nous appelons ici des protochlamydospores. Si cette transformation a lieu et que la croissance s'arrête alors, la dernière de ces cellules devient une chlamydospore. La différence entre une protochlamydospore dans une chaîne et une chlamydospore est que cette dernière a une paroi plus épaisse et qu'elle ne bourgeonne plus. Ce qui nous apparaît important maintenant c'est moins la chlamydospore que le changement morphologique, et ce changement n'est pas obligatoirement lié à la fin de la croissance.

Tableau 3 : Indices de chlamydosporulation de *Candida albicans* après 24 heures de culture dans de l'eau de riz additionnée de différentes quantités de glucose et d'azote (sous forme de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).



2.2.1.3) influence de la concentration de glucose et de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : le tableau 4 montre que les concentrations optimales sont de 0,5 g de glucose par litre et de 0,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  par litre.

2.2.1.4) influence de la concentration de glucose et de biotine : l'addition de biotine dans l'eau de riz glucosée, à quelle concentration que ce soit, diminue l'indice de chlamydosporulation (tableau 5). Cependant, les concentrations de 10 et même 20  $\mu\text{g/l}$  ne sont pas complètement inhibitrices et il est impossible de savoir, par des expériences en présence d'eau de riz, si la biotine est nécessaire à faible concentration pour la production des chlamydo-spores de *C. albicans*. Nous avons remarqué que des lots de crème de riz provenant de différents fabricants ne sont pas tous aussi favorables à la



Tableau 4 : Indices de chlamydosporulation de *Candida albicans* après 24 heures de culture dans de l'eau de riz additionnée de différentes quantités de glucose et de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

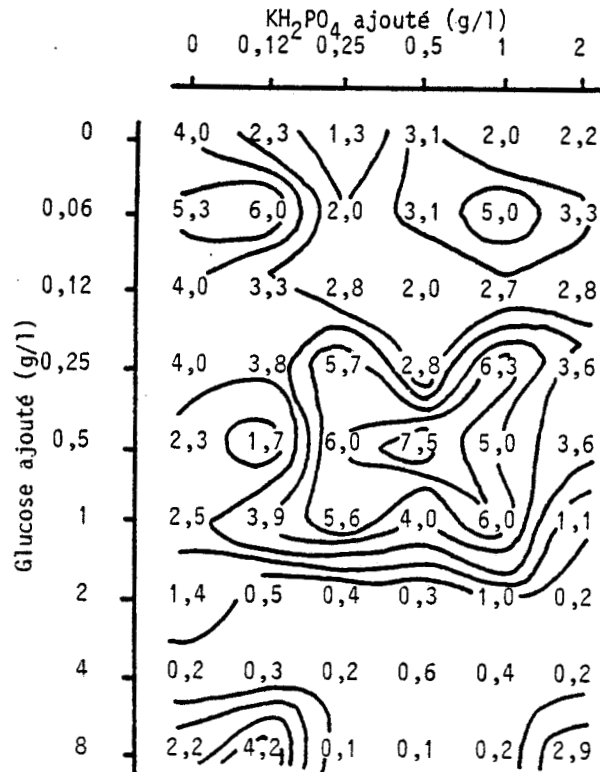
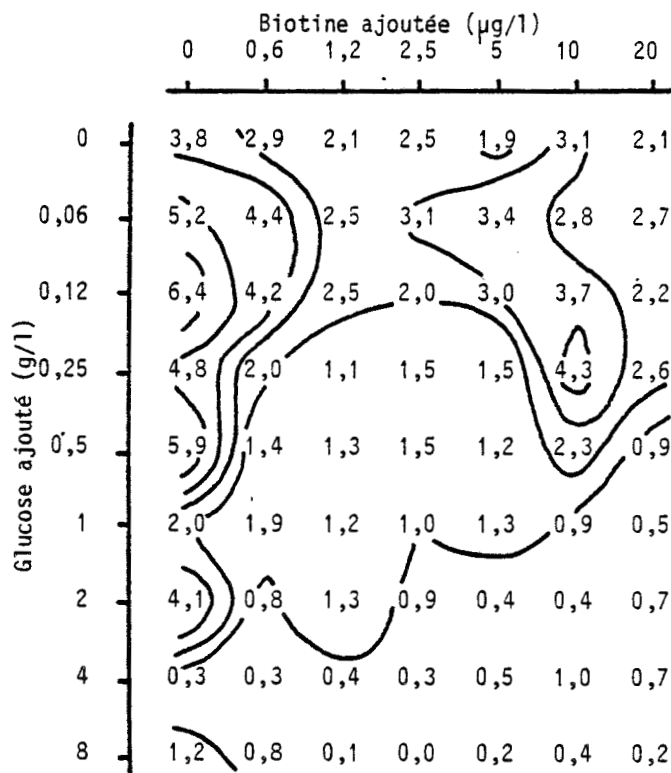


Tableau 5 : Indices de chlamydosporulation de *Candida albicans* après 24 heures de culture dans de l'eau de riz additionnée de différentes quantités de glucose et de biotine.

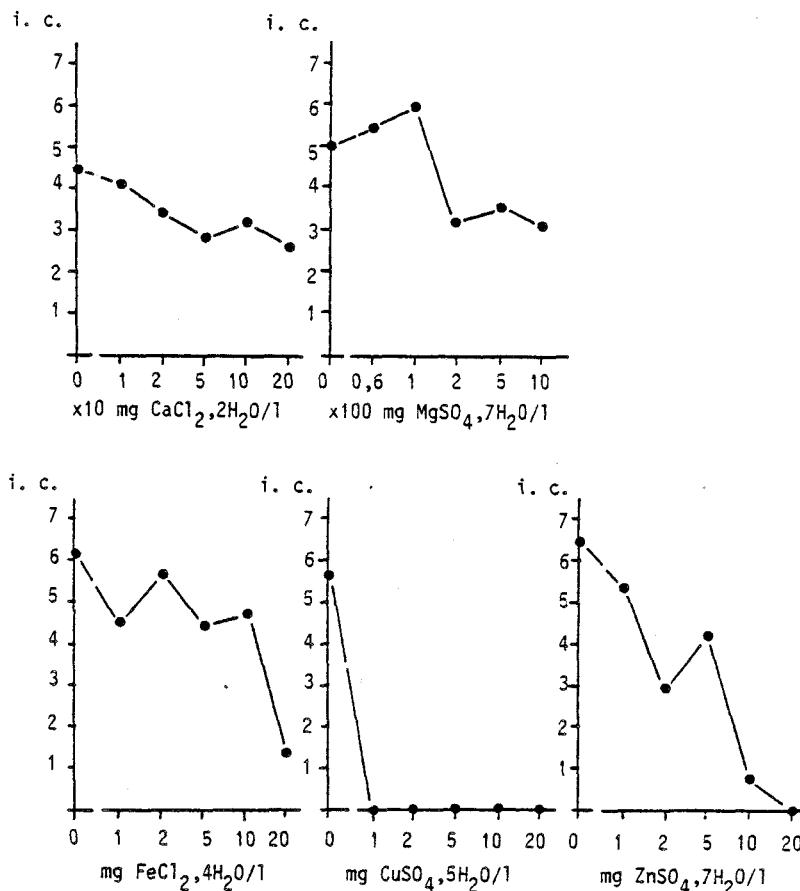


BUS  
LILLE

production des chlamydo-spores ; l'addition d'un mélange de thiamine (100 µg/l) et de biotine (5 µg/l) augmente légèrement les indices de chlamydo-spore dans le milieu le moins favorable et au contraire réduit les indices dans le meilleur milieu. Il est probable qu'il existe une concentration optimale de biotine. La croissance de *Candida albicans* en absence de cette vitamine est d'ailleurs très faible. Selon YAMAGUCHI (126) la biotine a un effet sur la morphologie de *C. albicans* : des concentrations de 0,1 ou 10 µg/l induisent, selon lui, respectivement la phase mycélienne ou la phase levure dans le milieu synthétique qu'il préconise.

2.2.1.5) influence de  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $FeCl_2$ ,  $CuSO_4$ ,  $ZnSO_4$  :  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $CuSO_4$  et  $ZnSO_4$  ont été ajoutés séparément dans l'eau de riz additionnée de 0,5 g/l de glucose. La figure 12 indique les indices de chlamydo-spore en fonction des concentrations de sels minéraux ajoutés.

Figure 12 : Indices de chlamydo-spore (i.c.) de *Candida albicans* après 24 heures de culture dans de l'eau de riz + 0,5 g de glucose/l en fonction des quantités de sels minéraux ajoutés.



$\text{CuSO}_4$  a un effet inhibiteur très important ; pour les concentrations supérieures à 2 mg/l de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , même la croissance est inhibée. Il en va tout autrement dans les milieux de culture plus concentrés en glucose et en azote où des concentrations 5 fois plus importantes de  $\text{CuSO}_4$  n'empêchent pas la croissance.

$\text{ZnSO}_4$  et  $\text{FeCl}_2$  diminuent aussi la production des chlamydo-spores mais ces sels sont tolérés à des concentrations plus fortes que  $\text{CuSO}_4$ . Les concentrations de  $\text{MgSO}_4$  et  $\text{CaCl}_2$  peuvent être relativement importantes et ne pas diminuer l'indice de chlamydo-sporeulation. L'addition de ces sels dans l'eau de riz n'augmente cependant pas notablement le nombre de chlamydo-spores produites, sans qu'on puisse en conclure qu'ils ne seraient pas indispensables dans un milieu de culture synthétique.

2.2.1.6) influence des conditions de préculture : nous avons évoqué cette influence à propos des tableaux 1 et 2. Nous avons constaté que les différences observées sont reproductibles. Les tableaux 6 et 7 sont équivalents des tableaux 1 et 2 respectivement : lorsque la préculture est effectuée dans du milieu de Sabouraud agité à 37°C, l'influence de la concentration de glucose dans l'eau de riz a moins d'importance que lorsque la préculture se fait dans un milieu synthétique stable à 28°C.

Il y a beaucoup de différences entre les deux types de préculture : nature du milieu, agitation ou non, température. La comparaison des tableaux 6 à 11 semble indiquer que la différence observée initialement (tableaux 1 et 2) est due principalement à l'agitation ou non du milieu (bien que nous n'ayons pas étudié les milieux agités à 28°C). Une préculture en milieu agité diminue l'importance de la concentration du glucose dans le milieu où l'on produit les chlamydo-spores. Le tableau 12 indique les indices de chlamydo-sporeulation lorsque la préculture est effectuée dans du milieu de Sabouraud à 37°C dans des tubes de Hall, en anaérobiose. On obtient un diagramme semblable à celui obtenu avec les précultures non agitées. On peut penser que les différences observées entre les tableaux 1 et 2 sont dues à une préculture en aérobiose ou en anaérobiose : en effet les cultures non agitées sont effectuées dans des tubes à essai de 18 x 180 mm contenant 10 ml de milieu incubés verticalement. Les levures se déposent et se développent dans le fond des tubes dans des conditions d'anaérobiose ; les cultures agitées sont effectuées dans des flacons de grand diamètre (8 cm), contenant 50 ml de milieu, elles sont brassées par l'agitation ; les levures se développent en aérobiose.

Tableau 6 : Milieu synthétique, culture stable, 28°C.

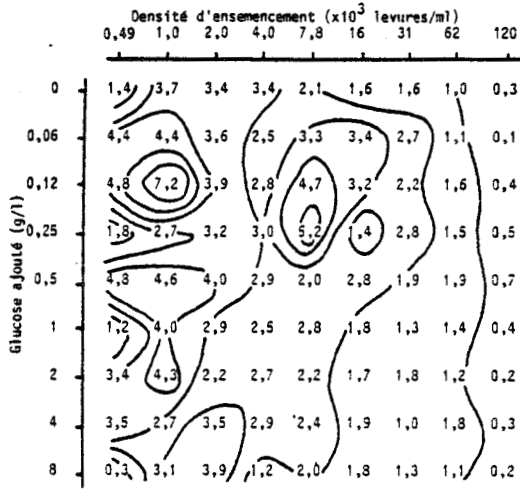


Tableau 7 : Milieu de Sabouraud, culture agitée, 37°C.

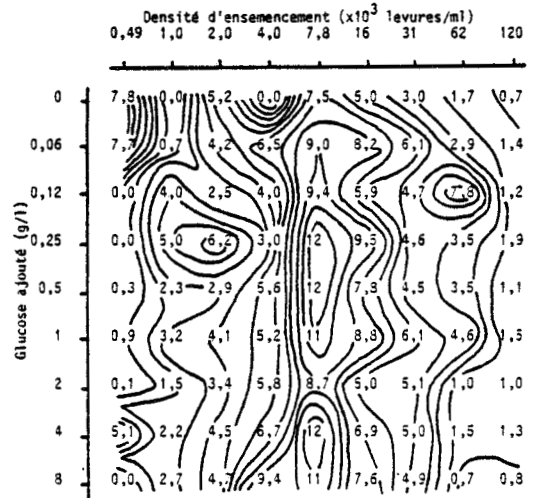


Tableau 10 : Milieu de Sabouraud, culture stable, 28°C.

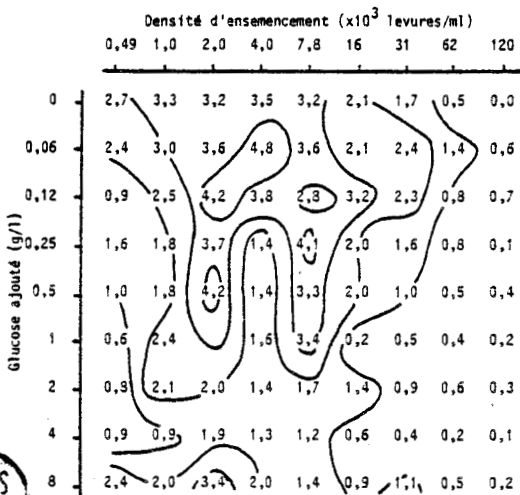


Tableau 11 : Milieu synthétique, culture agitée, 37°C.

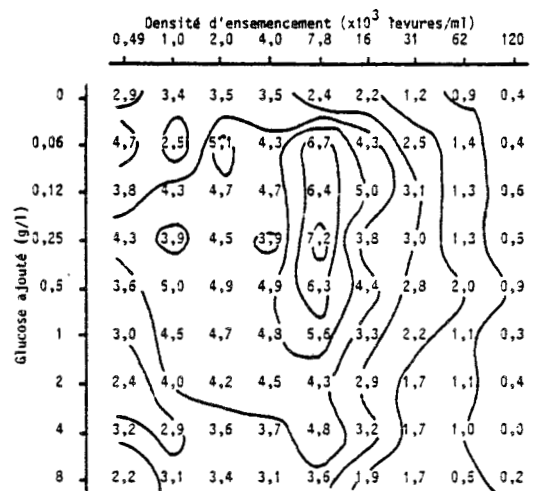


Tableau 8 : Milieu de Sabouraud, culture stable, 37°C.

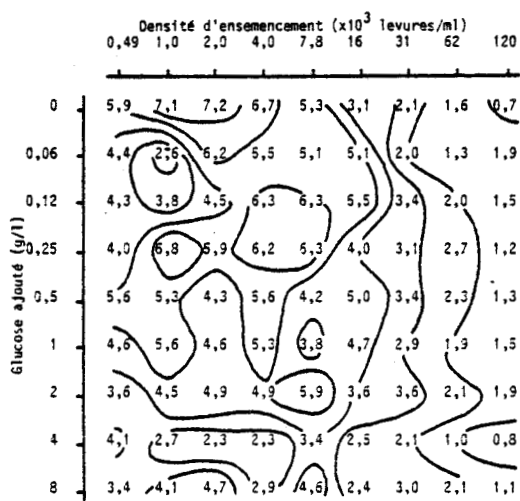
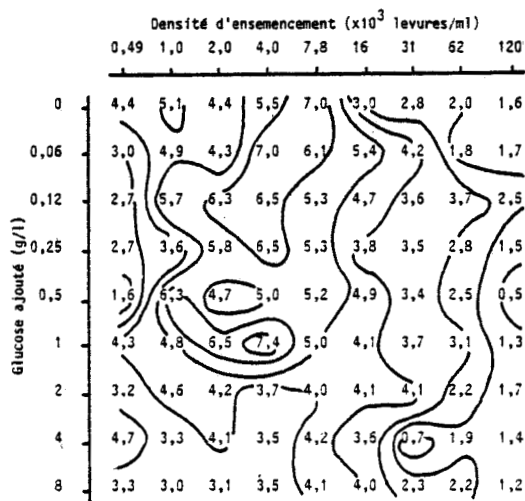


Tableau 9 : Milieu synthétique, culture stable, 37°C.



Tableaux 6 à 12 : Influence des conditions de préculture.

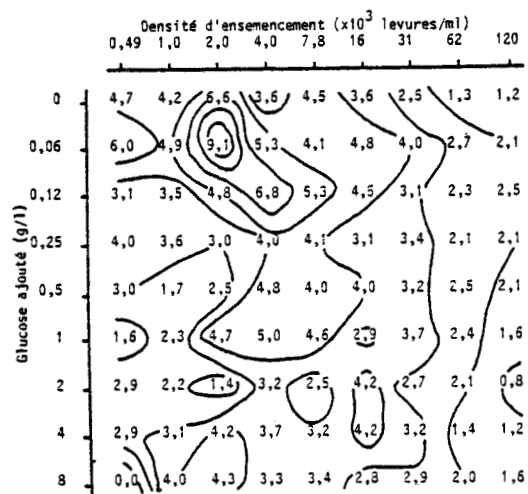
Dans chaque tableau : indices de chlamydosporelation de *Candida albicans* après 24 heures de culture dans de l'eau de riz additionnée de différentes quantités de glucose en fonction de la densité d'ensemencement.

Au-dessus de chaque tableau : conditions de précultures.

milieux : Sabouraud ou synthétique liquides. culture stable en tubes 18 x 180 mm ou agité en flacon de 8 cm de diamètre intérieur ou en tube de Hall.

températures : 28 ou 37°C.

Tableau 12 : Milieu de Sabouraud, culture en tube de Hall, 37°C.



2.2.1.7) conclusion : nos résultats permettent d'affirmer que l'apport dans le milieu de culture de substances complexes ou inhabituelles telles que tween, bile, N-acétyl-D-glucosamine, ou "chitosan" n'est nullement indispensable à la chlamydosporulation de *Candida albicans*. Par contre, la densité d'ensemencement nous paraît être un facteur très important à respecter bien qu'il soit très souvent négligé. L'essai suivant a été réalisé sur un milieu gélosé couramment utilisé dans les laboratoires d'analyses médicales, le riz-agar-tween (R.A.T.) (21). Nous espérons ainsi attirer l'attention sur l'importance du facteur "ensemencement" et faciliter le travail d'identification de *C. albicans*.

Les cultures sont effectuées dans des boîtes de Pétri de 8 cm de diamètre intérieur. Ces boîtes sont remplies de milieu RAT de manière à obtenir une couche de milieu de culture de 2,5, 5 et 10 mm (soit 12,5, 25 et 50 ml de milieu par boîte). Les boîtes sont ensemencées à l'aide de 1 ml de suspension contenant  $10^5$ ,  $10^6$  ou  $10^7$  levures provenant d'une culture de 24 heures à 37°C sur milieu de Sabouraud gélosé du clone 6311.5 de *Candida albicans*. Les boîtes sont incubées à 28°C à l'obscurité et observées 24 heures plus tard.

On détermine alors le nombre de chlamydospores par unité de surface. Pour ce faire, la boîte est observée au faible grossissement du microscope muni d'une chambre claire. Ce dispositif permet l'observation simultanée de la culture et d'un quadrillage délimitant des carrés de 0,1 mm de côté sur cette culture. On compte les chlamydospores sur 25 (5 x 5) carrés et ceci 16 fois à des endroits différents de la boîte de Pétri.

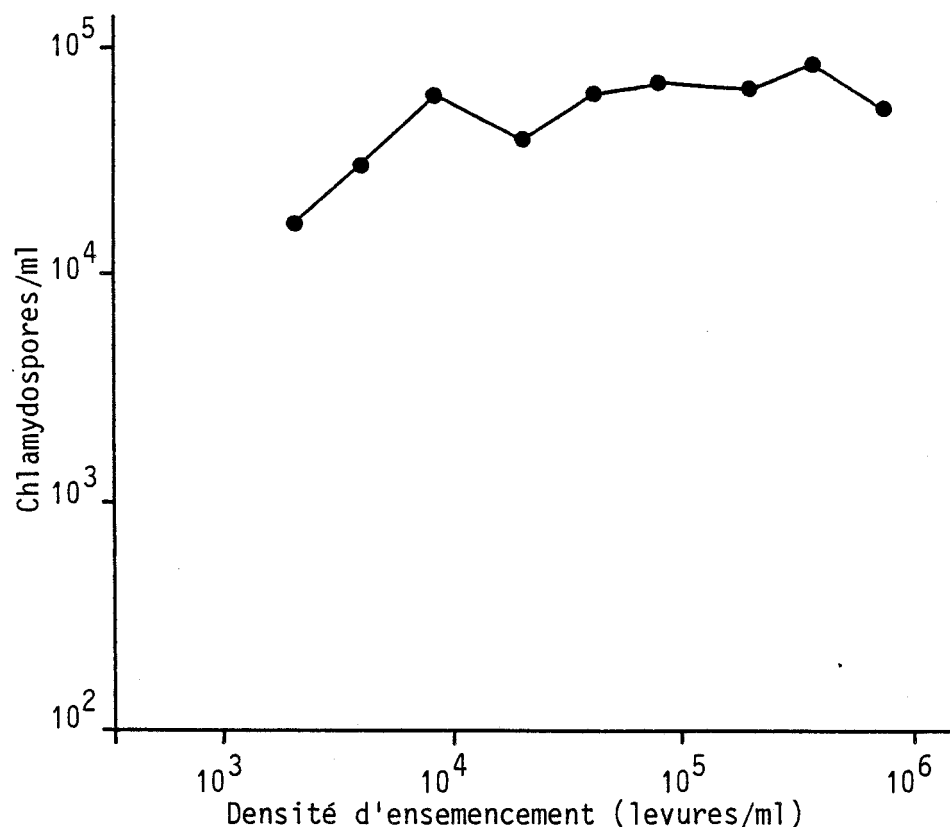
Les nombres de chlamydospores par  $\text{mm}^2$  de culture en fonction de l'épaisseur du milieu de culture en mm et du nombre de blastospores ensemencées sur la surface totale de la boîte, sont les suivants :

Épaisseur du milieu (mm)	Levures ensemencées par boîte		
	$10^5$	$10^6$	$10^7$
2,5	159	182	140
5	162	324	419
10	180	408	662

On voit que, dans nos conditions expérimentales, la densité d'ensemencement n'a pas d'influence sur la quantité de chlamydo-spores produites par  $\text{mm}^2$  si l'épaisseur du milieu de culture est faible (2,5 mm). Par contre, lorsque cette épaisseur est plus importante (5 ou 10 mm), le nombre de chlamydo-spores produites par  $\text{mm}^2$  est d'autant plus grand que l'inoculum est plus important. Tout se passe comme si la faible épaisseur du milieu de culture était un facteur limitant, empêchant une production importante de chlamydo-spores.

Si l'on indique sur un graphique le nombre de chlamydo-spores produites/ml de milieu en fonction de la densité d'ensemencement (en levures/ml) on obtient (figure 13) un résultat identique à celui de la figure 11 obtenu en milieu liquide, mais nous n'avons pas de mesures pour les plus faibles densités d'ensemencement sur milieu gélosé. Indiquons que si l'on augmente davantage la densité d'ensemencement (en augmentant le nombre de levures ensemencées ou en diminuant l'épaisseur du milieu) on n'observe plus de production de chlamydo-spores (pour les densités d'ensemencement de l'ordre de  $2,5 \times 10^6$  levures/ml).

Figure 13 : Nombre de chlamydo-spores produites par unité de volume en fonction de la densité d'ensemencement chez *Candida albicans* après 24 heures de culture sur milieu Riz-Agar-Tween.



En milieu gélosé, on cherche à obtenir une forte densité de chlamydozoaires par unité de surface ; on a donc intérêt à utiliser une épaisseur de milieu de culture suffisante ; il faut ensuite ajuster la densité d'ensemencement : si elle est trop faible, on ne tirera pas parti de la quantité de milieu utilisé (nous montrerons ultérieurement, au paragraphe 2.3.4, que de cette manière on retarde l'apparition des chlamydozoaires) ; si la densité d'ensemencement est trop forte, on n'obtiendra plus du tout de chlamydozoaires. Il n'est bien sûr pas question d'imposer, dans la routine des analyses, une numération du nombre de levures ensemencées, mais d'indiquer de quelle manière chacun peut corriger ses habitudes pour obtenir de meilleurs résultats.

### 2.2.2. FORMULATION DE MILIEUX SYNTHETIQUES.

2.2.2.1) pourquoi rechercher des formules de milieux synthétiques ? : les milieux de culture synthétiques ont une composition définie et sont par conséquent reproductibles avec cependant une certaine incertitude liée au degré de pureté des produits utilisés pour leur confection et à la précision des mesures.

On a tendance à penser que la reproductibilité du milieu est garant de la reproductibilité du déroulement de la culture elle-même. Ceci n'est pas exact. Pour qu'une expérience (une culture par exemple) soit reproductible il faut qu'elle soit insensible aux petites perturbations. La recherche d'un milieu de culture, synthétique ou non, devra respecter cette condition de stabilité. La reproductibilité des expériences est quelquefois obtenue plus facilement à l'aide d'un milieu naturel qu'à l'aide d'un milieu synthétique.

La recherche de milieux synthétiques n'a pas obligatoirement pour but la reproductibilité. Dans les études physiologiques, les variations que l'on peut imposer aux milieux synthétiques feront rechercher certaines règles, certaines relations à respecter entre les constituants, pour obtenir de manière reproductible le résultat recherché (la production de chlamydozoaires de *Candida albicans*, par exemple). Le but est donc plutôt l'analyse de la reproductibilité.

Lorsqu'on veut élaborer un milieu synthétique, on doit faire un certain nombre de choix ; d'abord un choix qualitatif : quels seront les



constituants du milieu ? ; ensuite des choix quantitatifs : quelles seront les concentrations des constituants ? Après avoir choisi et trouvé un milieu favorable, on fera varier les concentrations des constituants ; supposons que le milieu soit confectionné à l'aide de 9 constituants. On peut représenter ce milieu par un point dans un espace à 9 dimensions. Les autres conditions de la culture (densité d'ensemencement, température, éclaircissement, etc...) sont fixées et il s'agit de définir un ensemble dans cet espace à 9 dimensions tel qu'en choisissant n'importe quel point de l'ensemble on obtienne, de façon certaine, des chlamydozoaires. Très souvent on fixe à l'avance un délai maximum pour obtenir le phénomène.

Définir expérimentalement l'ensemble des milieux favorables à la chlamydozoaire de *C. albicans* est une tâche pratiquement irréalisable. On se limitera donc à l'étude de quelques sections planes de cet ensemble à 9 dimensions, et les conclusions que nous pourrions en tirer devront rester dans les limites des conditions explorées.

Si l'on envisage ensuite des modifications qualitatives du milieu (un choix de constituants différents), le même travail peut être refait... Nul ne peut avoir la prétention d'épuiser un tel sujet.

#### 2.2.2.2) étude de variations quantitatives :

choix des conditions et des constituants : cette étude a été effectuée avec le clone 6311.5 de *Candida albicans* déjà utilisé précédemment. Les levures qui servent à ensemencer les milieux synthétiques proviennent de deux cultures successives de 24 heures dans 50 ml de milieu liquide de Sabouraud (glucose 20 g/l, néopeptone Difco 10 g/l) inoculés à l'aide de  $5 \times 10^5$  levures et incubés à l'obscurité à 37°C dans un bain marie agité (1 mouvement par seconde).

Les levures récupérées par centrifugation à 2 200 g pendant 15 minutes sont lavées 3 fois dans de l'eau bidistillée.

Les milieux synthétiques contiennent les éléments suivants : glucose,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ , biotine, NaOH. Ils sont réalisés à l'aide d'eau bidistillée. Le choix des constituants a été guidé par l'étude précédente dans l'eau de riz enrichie. La biotine et la soude sont stérilisées par filtration et ajoutées au milieu après autoclavage.

Les cultures sont effectuées dans des fioles de Legroux contenant 10 ml de milieu synthétique et un inoculum de  $10^5$  levures ( $10^4$  levures/ml). Elles sont incubées à l'obscurité à  $28^\circ\text{C}$  et observées 24 heures plus tard. Les résultats sont appréciés par l'indice de chlamydosporulation.

choix des concentrations, choix des plans explorés : comme nous l'avons expliqué précédemment, nous avons exploré l'espace à 9 dimensions défini par les constituants du milieu synthétique en nous déplaçant dans certains plans c'est à dire en ne faisant varier que les concentrations de deux constituants à la fois. Il fallait néanmoins se choisir un point de départ, fixer l'ensemble des concentrations avant d'explorer les plans retenus. Dans les premières études nous avons choisi de ne pas modifier le pH des milieux ( $\text{NaOH} = 0$ ). Le choix des concentrations des 8 autres constituants a été résolu de deux manières différentes. Pour un premier travail (19), nous avons fixé ces concentrations d'après les résultats obtenus dans l'eau de riz enrichie. Plus tard nous avons déterminé les concentrations des différents constituants de telle sorte qu'on obtienne une croissance maximale (estimée par la masse sèche après trois jours de culture à  $28^\circ\text{C}$  en milieu liquide agité) pour une concentration minimale des constituants, la concentration de glucose étant fixée arbitrairement à 10 g/l. Cette détermination des concentrations a été faite à l'aide d'une méthode d'optimisation par recherche directe (méthode de ROSENBROCK (79) modifiée). La formule obtenue définit le "milieu optimisé", elle est la suivante : glucose : 10 g ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  : 0,750 g ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0,10 g ;  $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,020 g ;  $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$  : 0,005 g ;  $\text{FeCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$  : 0,20 mg ;  $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,060 mg ; biotine : 0,25  $\mu\text{g}$  ; eau bidistillée : 1 000 ml. On obtient dans ce milieu une masse sèche de 230 mg de levures pour 100 ml de milieu après 3 jours de culture à  $28^\circ\text{C}$  (culture agitée à 1 mouvement par seconde).

Dans ce "milieu optimisé" nous avons étudié l'influence des concentrations de glucose et de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  puis plus tard l'influence de NaOH. Dans la première étude en milieu non optimisé nous avons étudié également l'influence de la concentration de biotine.

résultats :

a) milieux non optimisés : leur formule est la suivante :  
constituants en concentration constante :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0,5 g/l ;  $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,1 g/l ;  $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$  : 0,01 g/l ;  $\text{FeCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$  : 0,001 g/l ;  $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,001 g/l ;

Tableau 13 : Indices de chlamydosporulation de *Candida albicans* cultivé dans un milieu de culture synthétique liquide en fonction des concentrations de glucose et d'azote et en présence de 0,016 µg/l de biotine.

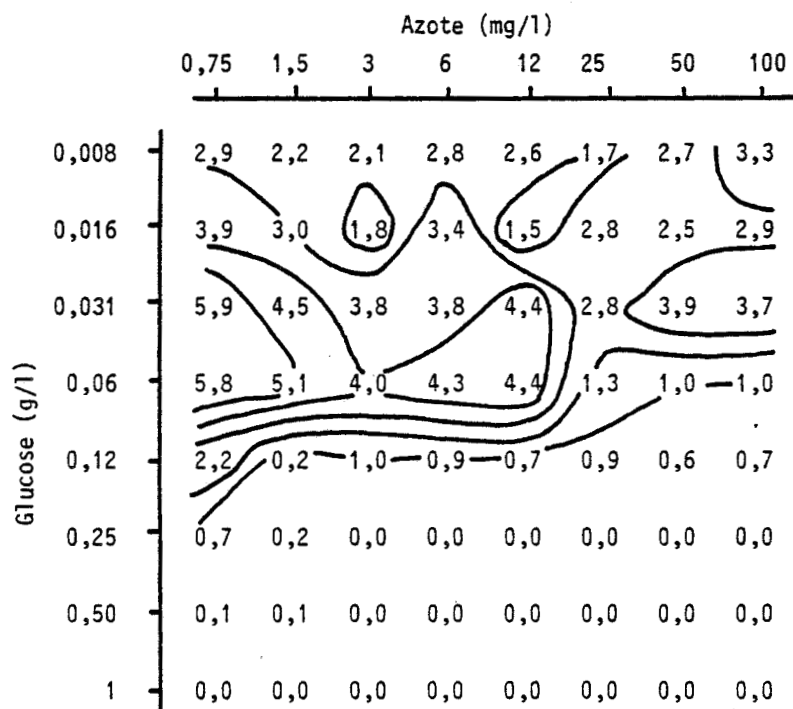
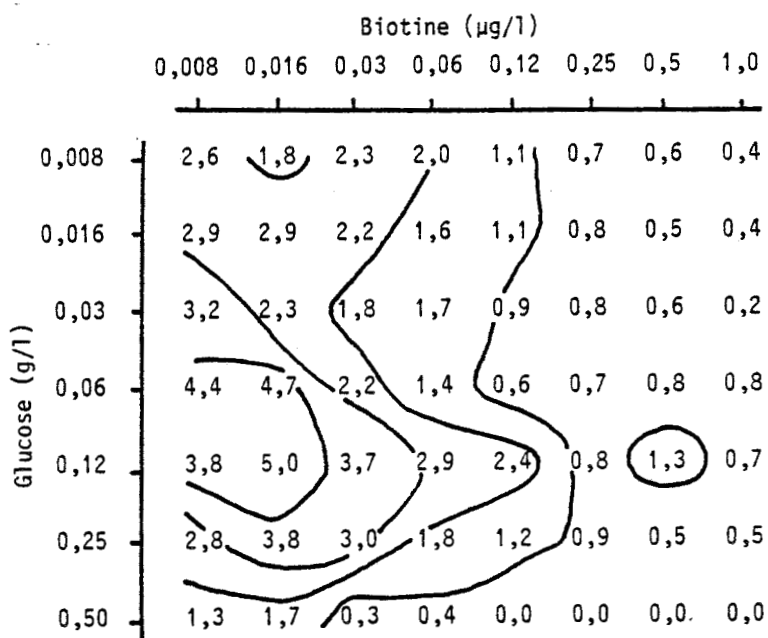


Tableau 14 : Indices de chlamydosporulation de *Candida albicans* cultivé dans un milieu de culture synthétique liquide en fonction des concentrations de glucose et de biotine et en présence de 1,5 mg N/l.



Tableaux 15 et 16 : Indices de chlamydosporulation de *Candida albicans* cultivé dans un milieu de culture synthétique liquide en fonction des concentrations d'azote et de biotine et en présence de glucose aux concentrations de 0,016 g/l (tableau 15) ou de 0,12 g/l (tableau 16).

Tableau 15.

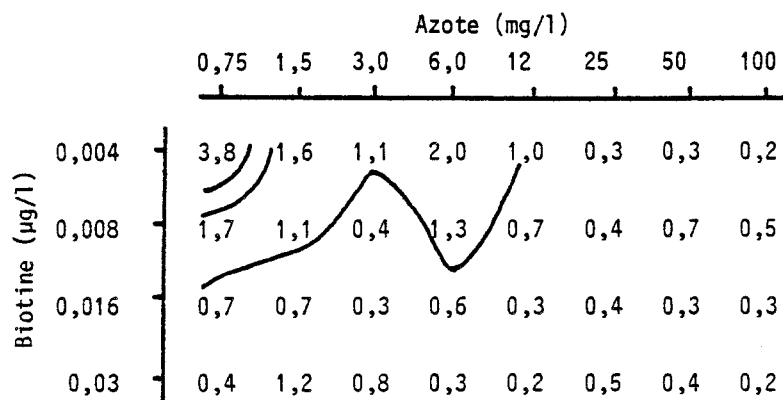
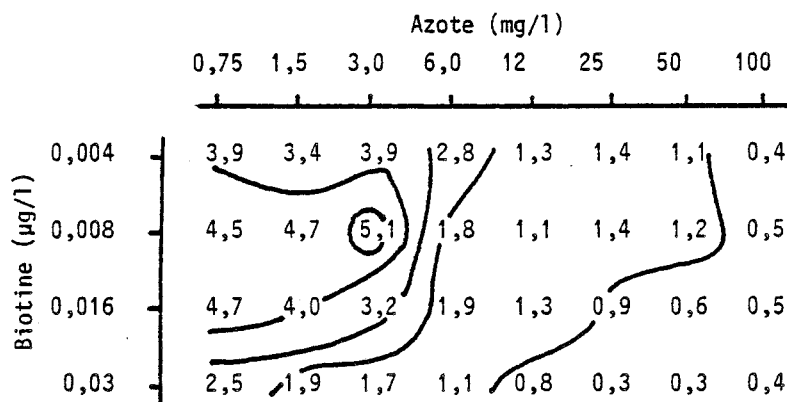


Tableau 16.



constituants en concentrations variables : glucose,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , biotine. La concentration de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sera indiquée en concentration d'azote.

Les tableaux 13 à 16 indiquent les résultats obtenus dans 4 plans. Il faut signaler, pour le tableau 13, que l'on obtient, avec les concentrations de 0,25 g et plus de glucose par litre, des chaînes de protochlamydo-spores.

L'ensemble de ces tableaux indique un optimum de chlamydo-sporulation pour le triplet glucose 0,06-0,12 g/l, azote 0,75-3 mg/l et biotine 0,008-0,016  $\mu\text{g/l}$ . Cet optimum n'est valable, bien entendu, qu'en fonction des autres conditions de la culture.

b) milieux optimisés : la formule du "milieu optimisé" est indiquée plus haut. Dans ce milieu de culture, on n'obtient que des levures. Ce milieu a été utilisé pour la production de chlamydo-spores en diminuant seulement les concentrations de glucose et de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

*influence de la concentration de glucose et d'azote* : nous avons fait varier dans le milieu de culture les concentrations d'azote de 0,04 à 160 mg/l (soit 0,18 à 750 mg/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) et celles de glucose de 0,002 à 10 g/l. Les variations sont faites en progression géométrique de raison 2 ; le milieu le plus concentré correspond au "milieu optimisé".

Par la suite nous désignerons symboliquement les milieux de culture selon leur concentration de glucose et d'azote, par exemple "G 10-N 160" signifie milieu contenant 10 g/l de glucose et 160 mg/l d'azote, soit 0,750 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Nous avons déterminé les indices de chlamydo-sporulation pour les milieux contenant au plus 0,08 g/l de glucose ; ces indices sont indiqués dans le tableau 17. Pour les concentrations plus élevées, ces indices risquaient d'être faux et nous ne les avons pas calculés ; en effet, dans tous ces milieux, les cultures se présentent sous forme d'un mélange de thalles pseudomycéliens et de levures et il n'est pas aisé de distinguer les thalles effectivement issus d'une levure ensemencée. De plus les thalles pseudomycéliens portent quelquefois des chlamydo-spores atypiques. C'est pourquoi nous avons préféré décrire, pour l'ensemble des milieux, les différents aspects morphologiques que nous avons rencontrés.

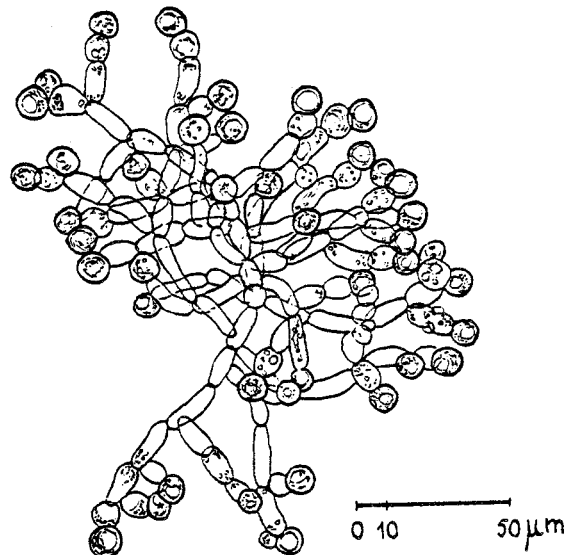
Tableau 17 : Indices de chlamydosporulation de *Candida albicans* cultivé dans le "milieu optimisé" en fonction des concentrations de glucose et d'azote.

		AZOTE (mg/l)												
		0,04	0,08	0,16	0,31	0,62	1,25	2,50	5,00	10,0	20,0	40,0	80,0	160
GLUCOSE (g/l)	0,002	0,6	0,3	0,6	0,4	0,2	0,6	0,7	0,4	0,7	0,4	0,0	1,0	0,5
	0,005	0,2	0,0	0,0	2,0	1,8	1,4	0,8	0,5	0,4	0,4	0,9	1,7	2,2
	0,010	1,0	0,6	0,7	1,7	1,7	2,0	1,6	2,9	1,8	1,7	1,1	3,2	1,1
	0,020	1,0	1,3	0,7	1,7	1,3	1,3	0,5	1,0	2,3	2,3	2,5	1,5	0,0
	0,040	2,2	0,6	0,8	4,6	5,1	5,1	3,8	3,9	3,3	2,3	1,8	1,4	1,2
	0,080	0,6	1,1	1,8	3,1	2,8	4,5	3,5	2,9	2,8	3,0	2,5	3,6	1,7

Dans les milieux contenant 2,5 g/l de glucose ou davantage, le développement se fait sous forme de levures. Parmi les milieux dont la concentration de glucose est inférieure à 2,5 g/l, nous distinguerons trois groupes :

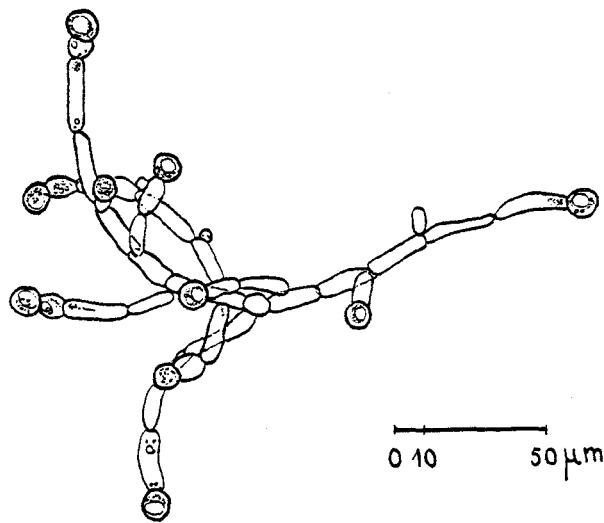
α. les milieux équilibrés en glucose et azote : nous appelons ainsi les milieux ayant le même rapport glucose/azote que le milieu optimisé. Les thalles obtenus dans le milieu "G 031-N 5" sont semblables à celui de la figure 14. Ils sont très développés, avec de nombreux rameaux pseudomycéliens. Tous ces rameaux, ou presque, se terminent par une cellule ampulliforme et une chlamydospore typique, ou rarement par une chaîne de trois cellules à contenu dense et granuleux ; ces cellules ont un diamètre de 8  $\mu$  environ. Entre les thalles pseudomycéliens, on observe de nombreuses levures.

Figure 14 : Aspect schématique d'un thalle de *Candida albicans* obtenu dans un milieu contenant 0,31 g/l de glucose et 5 mg/l d'azote.



A partir de ce type, on peut facilement décrire les thalles obtenus sur les milieux équilibrés contenant moins de glucose et d'azote. On y observe en effet des thalles de moins en moins ramifiés au fur et à mesure que les concentrations sont plus faibles, mais les rameaux se terminent par des chlamydospores typiques (exemple : milieu "G 0,04-N 0,62" ; figure 15). Entre les thalles pseudomycéliens, on observe de moins en moins de levures lorsque les concentrations de glucose et d'azote deviennent plus faibles.

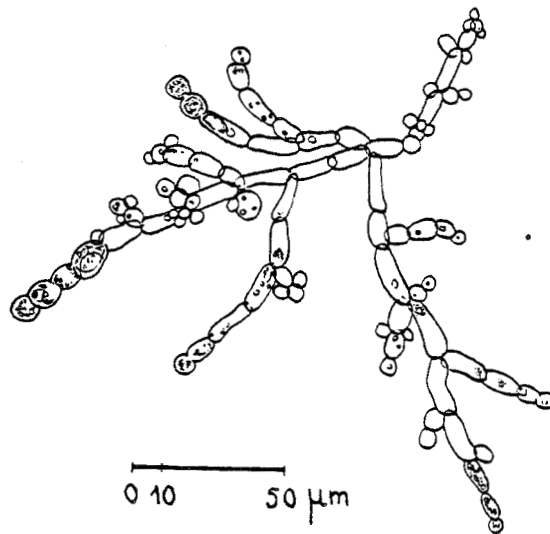
Figure 15 : Aspect schématique d'un thalle de *Candida albicans* obtenu dans un milieu contenant 0,04 g/l de glucose et 0,62 mg/l d'azote.



Si maintenant nous essayons de comparer au type "G 0,31-N 5" les thalles obtenus sur les milieux équilibrés plus concentrés, nous aurons à décrire des morphologies nouvelles.

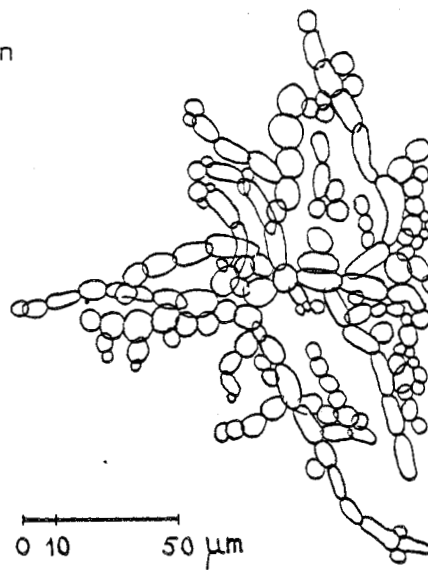
Dans le milieu "G 0,62-N 10" (figure 16), les rameaux des thalles pseudomycéliens se terminent, soit par une chaîne de cellules à contenu dense et granuleux, soit par une chlamydospore, ou tout simplement par un article de pseudomycélium. On observe aussi de nombreuses levures au niveau des nœuds du pseudomycélium ; les levures sont également abondantes dans le milieu de culture entre les thalles pseudomycéliens.

Figure 16 : Aspect schématique d'un thalle de *Candida albicans* obtenu dans un milieu contenant 0,62 g/l de glucose et 10 mg/l d'azote.



Si les concentrations de glucose et d'azote sont encore plus élevées, les thalles ont encore un aspect différent. Dans le milieu "G 1,25-N 20" on observe de très nombreuses levures et des thalles (figure 17) constitués d'articles allongés semblables aux articles pseudomycéliens classiques, mêlés à de grosses cellules rondes d'un diamètre d'environ 8 à 10 μ, dont le contenu est semblable à celui des articles allongés. On y voit des levures formées au niveau des noeuds. L'architecture de ces thalles semble fragile ; des fractions du thalle peuvent se séparer.

Figure 17 : Aspect schématique d'un thalle de *Candida albicans* obtenu dans un milieu contenant 1,25 g/l de glucose et 20 mg/l d'azote.



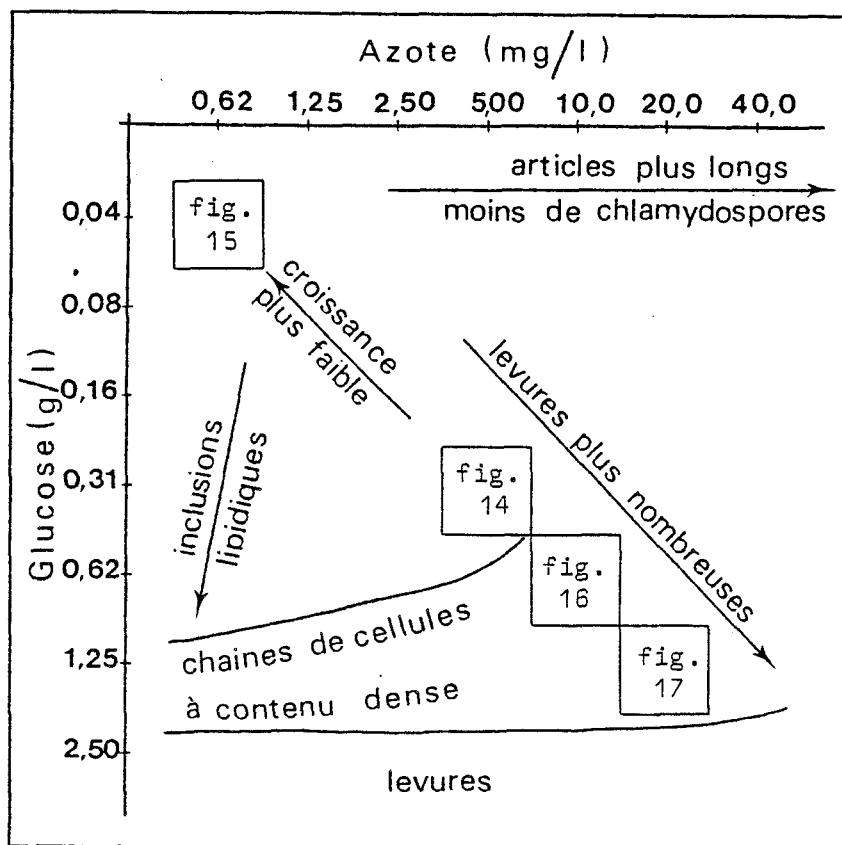


$\beta$ . les milieux non équilibrés et contenant un excès de glucose par rapport à l'azote : sur la figure 18 qui résume l'ensemble de nos observations, ces milieux sont situés en dessous de la diagonale des milieux équilibrés. Dans ces milieux se forment des thalles pseudomycéliens dont les articles contiennent de nombreuses inclusions lipidiques. La morphologie de ces thalles rappelle celle des thalles obtenus dans le milieu équilibré ayant la même concentration d'azote, avec cependant une tendance à la formation de chaînes terminales de cellules à contenu dense dans les milieux contenant 1,25 g/l de glucose.

$\gamma$ . les milieux non équilibrés et contenant un excès d'azote par rapport au glucose : sur la figure 18 ces milieux sont situés au dessus de la diagonale des milieux équilibrés. Dans ces milieux, la morphologie des thalles peut se décrire à partir de celle obtenue sur les milieux équilibrés et en considérant l'ensemble des milieux ayant la même concentration de glucose. De cette manière on voit que la morphologie des thalles évolue progressivement en fonction de la concentration d'azote. Cette évolution se fait par un allongement des articles du pseudomycélium et une diminution du nombre des chlamydo-spores. Dans les milieux où la concentration de glucose est faible (inférieure ou égale à 0,02 g/l) et celle d'azote forte, on observe fréquemment des cellules ampulliformes n'ayant pas produit de chlamydo-spores. Cela se traduit, par exemple, dans le tableau 16, par un indice de chlamydo-sporeulation nul dans le milieu "G 0,02-N 160"; chaque thalle portait cependant une ou plusieurs cellules ampulliformes.

Nous avons résumé l'ensemble de ces résultats sur la figure 18.

Figure 18 : Mode de développement et morphologie des thalles de *Candida albicans* obtenus dans le "milieu optimisé" en fonction des concentrations d'azote et de glucose.



*influence de NaOH* : si on ajoute, avant l'ensemencement, mais après autoclavage, 0,5 ou 1 ml de NaOH N par litre de milieu, les résultats sont modifiés de la manière suivante : on observe tout d'abord une diminution du nombre des levures après 24 heures de culture ; ensuite les thalles pseudomycéliens ont une allure plus ramassée car leurs articles sont moins allongés. Mais le fait plus étonnant a été la production de chlamydo-spores dans tous les milieux et donc avec des concentrations importantes de glucose et de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Nous avons alors voulu savoir s'il était possible de produire des chlamydo-spores en présence de concentrations encore plus élevées de glucose. L'optimisation du milieu a été faite pour une concentration de 10 g/l de glucose ; si nous augmentons la concentration de glucose, les autres constituants du milieu deviennent limitants. Pour éviter cela, nous avons réalisé l'essai suivant dans un milieu dont les constituants sont 10 fois plus concentrés que dans le milieu optimisé décrit au paragraphe 2.2.2.2, soit :

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 1 g/l ;  $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$  : 0,2 g/l ;  $\text{CaCl}_2,2\text{H}_2\text{O}$  : 0,05 g/l ;  $\text{FeCl}_3,4\text{H}_2\text{O}$  : 0,002 g/l ;  $\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$  : 0,001 g/l ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  : 7,5 g/l ; biotine : 2,5  $\mu\text{g/l}$  ; NaOH N : 5 ml/l. Le glucose variera de 0,1 à 100 g/l. Les pH des milieux sont tous très voisins de 7. Les fioles contenant 10 ml de milieu sont ensemencées à raison de  $10^4$  levures/ml (l'inoculum étant obtenu par une culture de 24 heures à 37°C sur milieu de Sabouraud gélosé), et incubées à 28°C. Après 24 heures de culture on observe des chlamydospores même en présence de 100 g de glucose par litre. Si on poursuit l'incubation 24 heures de plus, le nombre des chlamydospores n'augmente plus, contrairement à celui des levures qui continuent à se multiplier dans les milieux contenant plus de 1 g de glucose par litre.

Cette production de chlamydospores dans le milieu contenant 100 g de glucose par litre est intéressante car elle est contraire à ce que l'on pensait et à ce que l'on avait observé jusqu'à présent. Elle témoigne de l'inter-dépendance des facteurs : on ne peut produire des chlamydospores en présence de cette concentration de glucose que si d'autres conditions sont respectées. Enfin on peut affirmer que la production des chlamydospores n'est pas liée à l'arrêt de la croissance, car malgré l'absence de mesure, ce fait est évident par un simple examen des fioles après 24 et 48 heures de culture.

#### 2.2.2.3) variations qualitatives :

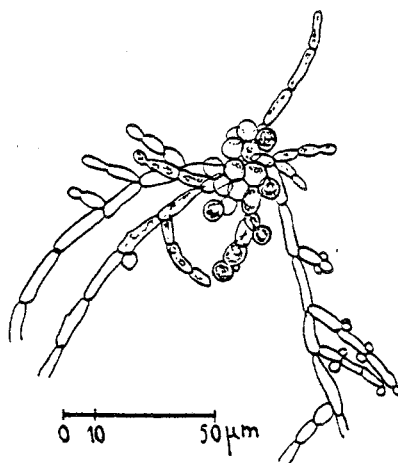
nature de la source carbonée : les phénomènes respiratoires interviennent dans la transformation levure-pseudomycélium-chlamydospore ; nous développerons ce thème dans le paragraphe 2.4 ; pour l'instant disons que cela nous a fait imaginer, à un certain moment, que l'influence inhibitrice du glucose correspondait peut-être à un phénomène de répression catabolique. Nous avons donc utilisé le galactose comme source carbonée afin de réduire cette éventuelle répression catabolique.

Les essais ont été réalisés en fiole de Legroux contenant 10 ml de milieu ensemencés à raison de  $10^4$  levures/ml. L'inoculum provenait d'une culture de 24 heures à 37°C sur milieu de Sabouraud gélosé. Les fioles étaient incubées à 28°C.

Si on remplace dans le "milieu optimisé", les 10 g de glucose par une quantité égale de galactose, on observe, après 24 heures de culture, de grands thalles pseudomycéliens. Rappelons qu'en présence de glucose nous n'obtenions que

des levures. La nature de la source carbonée intervient donc dans le phénomène morphogénétique et nous pourrions reprendre tout le travail précédent avec différents sucres. Nous avons étudié des milieux contenant du galactose et fait varier les concentrations de galactose, de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et de NaOH ajoutés au milieu. A part le décalage signalé plus haut, les résultats sont assez semblables après 24 heures de culture à ceux observés avec le glucose, en particulier, l'adjonction de soude dans le milieu conduit à la production de thalles à articles courts porteurs de nombreuses chlamydospores souvent disposées en chaînes. Il est intéressant cependant de noter l'évolution ultérieure des thalles obtenus dans le milieu type optimisé mais contenant 10 g de galactose par litre et 2 ml de NaOH N/l. En effet, après 5 jours de culture, les cellules du centre du thalle ont bourgeonné un pseudomycélium lui-même porteur de levures (figure 19).

Figure 19 : Aspect schématique d'un thalle obtenu après 5 jours de culture dans un milieu synthétique contenant 10 g de galactose par litre. Le centre du thalle porte des chlamydospores ; de longs rameaux pseudomycéliens sont également issus du centre.



Ceci montre la complexité de l'évolution des cultures ; on peut souhaiter élaborer des systèmes dont on contrôle mieux le devenir, en faisant en sorte que les paramètres et les variables n'évoluent plus en fonction du temps (de la durée de culture). Nous développerons cette idée ultérieurement (paragraphe 3.3).

.nature de la source azotée : au cours de notre longue recherche des conditions de production des chlamydospores de *Candida albicans*, nous avons souvent été tenté de modifier la composition du milieu de culture. Ainsi

à une certaine époque, nous avons fourni l'ion  $\text{PO}_4^{---}$  à l'aide de deux sels :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  afin de corriger le pH du milieu sans ajouter de NaOH. C'est dans un de ces milieux de culture que nous avons étudié l'influence de la source azotée. Les résultats ne peuvent se comparer qu'à l'intérieur de cette série expérimentale, avec une certaine prudence car la nature de la source azotée modifie également le pH du milieu par exemple.

Le milieu de culture avait donc la composition suivante :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0,18 g/l ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  : 0,28 g/l ;  $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$  : 0,1 g/l ;  $\text{CaCl}_2,2\text{H}_2\text{O}$  : 0,01 g/l ;  $\text{FeCl}_2,4\text{H}_2\text{O}$  : 0,001 g/l ;  $\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$  : 0,001 g/l ; glucose : 0,31 g/l, la source azotée apportait 160 mg N/l ; les milieux ne contenaient pas de biotine. 10 ml de milieu en fiole de Legroux étaientensemencés à raison de  $10^4$  levures/ml à l'aide d'une culture de 24 heures à 37°C sur milieu de Sabouraud gélosé. Ils étaient incubés à 28°C pendant 24 heures. Les sources azotées essayées étaient  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et 18 acides aminés. A la concentration employée, la tyrosine et la cystéine n'étaient pas complètement solubilisées. Nous avons cependantensemencé les milieux correspondants.

En présence de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , de sérine, d'alanine, de glyco-colle, de leucine, de valine, de méthionine, d'isoleucine ou de phénylalanine, on observe après 24 heures de culture des thalles pseudomycéliens portant de nombreuses chlamydo-spores ainsi que des levures dispersées dans le milieu ; nous n'avons observé que très peu de différence dans le développement des thalles.

En présence de thréonine ou de tryptophane, la croissance est assez faible, mais il se forme des thalles pseudomycéliens porteurs de chlamydo-spores et on observe également des levures.

En présence de lysine on observe des thalles pseudomycéliens qui bourgeonnent abondamment des levures ; un résultat du même type est obtenu en présence d'histidine avec la différence d'un bourgeonnement moins abondant des thalles pseudomycéliens. En présence de ces acides aminés on n'observe pas de production de chlamydo-spores.

En présence d'arginine ou de proline le développement est levuriforme ; en présence d'acide glutamique ou d'acide aspartique on observe des amas de levures qui ne se sont pas séparées. Enfin en présence de cystéine ou de tyrosine, la croissance est très faible et se fait sous forme de levures.

En ce qui concerne une influence éventuelle du pH, signalons que l'adjonction de 0,5 à 4 ml de NaOH N/litre de milieu contenant l'acide aspartique comme

source azotée ne modifie pas le résultat, on observe dans tous les cas des amas de levures.

Nous avons réalisé cet essai de différentes sources azotées dans l'espoir de n'avoir plus aucune levure dans le milieu après 24 heures de culture. Les résultats n'ayant pas été satisfaisants en fonction de ce critère nous n'avons pas poursuivi dans cette voie.

N-acétyl-D-glucosamine : STRIPPOLI et SIMONETTI (107) tiennent la N-acétyl-D-glucosamine pour la substance clé du dimorphisme (transformation levure-mycélium) et de la variation morphologique (production de chlamydospore) chez *Candida albicans*. Nous avons réalisé quelques essais relatés dans (20). Nous avons comparé les six milieux dont la composition est la suivante :

	1	2	3	4	5	6
N-acétyl-glucosamine (g/l)	1	1	0	0,125	0,125	0
glucose (g/l)	0	0	1,08	0	0	0,135
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/l)	0	0	0,3	0	0	0,037
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/l)	0	0,5	0,5	0	0,5	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/l)	0	0,1	0,1	0	0,1	0,1
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (g/l)	0	0,01	0,01	0	0,01	0,01
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O (g/l)	0	0,001	0,001	0	0,001	0,001
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/l)	0	0,001	0,001	0	0,001	0,001

Les cultures sont effectuées en fioles de Legroux contenant 10 ml de milieu. Elles sontensemencées à raison de 10<sup>4</sup> levures/ml, levures provenant d'une culture de 24 heures à 37°C sur milieu de Sabouraud gélosé. Les fioles sont incubées à 28°C à l'obscurité et observées 24 heures plus tard.

Les milieux 1, 2 et 3 d'une part et 4, 5 et 6 d'autre part contiennent les mêmes quantités de carbone et d'azote soit 430 mg C/l et 63 mg N/l et 54 mg C/l et 8 mg N/l respectivement. Le milieu 1 correspond à celui proposé par STRIPPOLI

et SIMONETTI. On constate qu'effectivement on obtient dans ce milieu des thalles pseudomycéliens porteurs des chlamydo-spores malgré l'absence de sels minéraux. Dans un milieu composé uniquement de glucose et de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , que nous avons essayé par ailleurs, on n'observe pas de croissance (tout au plus le bourgeonnement de quelques levures) et pas de production de chlamydo-spore. L'adjonction de sels minéraux à la N-acétyl-D-glucosamine réalise le milieu 2. Dans ce milieu, les thalles pseudomycéliens produits ont des articles courts et on observe fréquemment des chaînes de protochlamydo-spores. Dans le milieu 3 qui ne contient pas d'acétyl-D-glucosamine, les thalles pseudomycéliens ont des articles longs et portent des chlamydo-spores. Un résultat identique est obtenu dans les milieux 4, 5 et 6.

Nous avons remarqué également que les indices de chlamydo-sporeulation sont plus élevés dans les milieux 2 et 5 que dans les milieux 1 et 4 respectivement. Ceci est lié à une croissance plus importante lorsque les milieux contiennent des sels minéraux en plus de la N-acétyl-D-glucosamine.

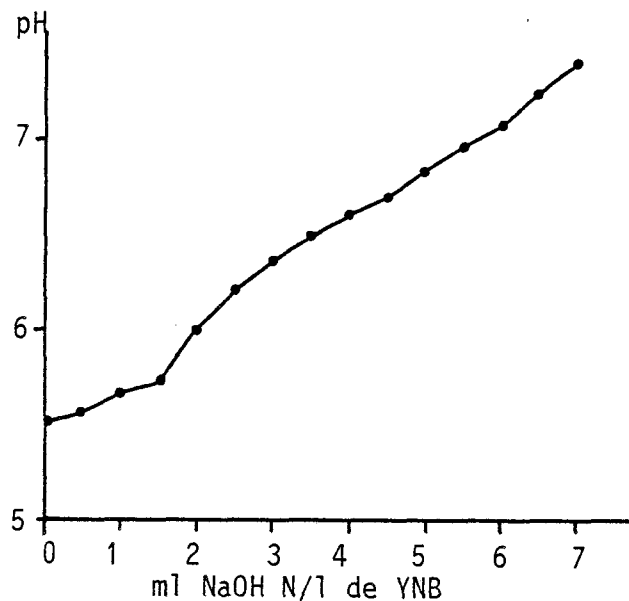
SIMONETTI et Coll. (101) indiquent qu'ils obtiennent des tubes germinatifs à partir des levures de *Candida albicans* lorsqu'ils incubent à 37°C les cultures réalisées dans la solution de N-acétyl-D-glucosamine. Nous avons constaté que, d'une manière générale, les milieux favorables à la chlamydo-sporeulation permettent, si les cultures sont incubées à 37°C, la formation de tubes germinatifs, aussi bien à partir des levures que du pseudomycélium ou des chlamydo-spores âgées de quelques heures.

.utilisation du milieu "Yeast-Nitrogen-Base " : pour effectuer certains types de recherche, l'utilisation d'un milieu de culture synthétique peut être souhaitable. Cependant la confection de ces milieux est relativement longue et le recours à un milieu déjà élaboré et commercialisé peut être une aide précieuse dans certains cas. Nous avons pensé pouvoir rendre service en conseillant l'emploi du "Yeast-Nitrogen-Base" (YNB), milieu commercialisé par Difco et dont tous les constituants sont chimiquement définis.

Ce milieu ne contient pas de source carbonée, il convient donc d'y ajouter du glucose ; pour obtenir des chlamydo-spores de *Candida albicans* il faut de plus augmenter le pH à l'aide de soude, et respecter une certaine densité d'ensemencement.

La figure 20 montre la courbe de neutralisation de YNB. Nous avons réalisé des milieux à 0,1, 1 ou 10 g de glucose par litre et nous avons ajouté 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 ml de NaOH N par litre de milieu ; la soude est stérilisée par filtration et ajoutée après autoclavage.

Figure 20 : Courbe de neutralisation du milieu YNB : pH en fonction de la quantité de NaOH N ajoutée.



L'essai a été réalisé en fioles de Legroux contenant 10 ml de milieu. Celles-ci sontensemencées à l'aide de levures provenant d'une culture de 24 heures à 37°C sur milieu de Sabouraud gélosé. Les densités d'ensemencement testées sont  $10^4$ ,  $10^5$  et  $10^6$  levures/ml. Les fiolesensemencées sont incubées à 28°C à l'obscurité et observées 24 heures plus tard.

Dans les milieux sans adjonction de soude, on n'obtient de chlamydospores qu'en présence de 0,1 g de glucose par litre et avec les densités d'ensemencement de  $10^4$  et  $10^5$  levures/ml. Ces chlamydospores sont peu nombreuses, tous les thalles pseudomycéliens n'en portent pas. De plus de nombreuses levures sont produites dans ces milieux. Par contre les thalles pseudomycéliens ont des articles très allongés (figure 21A).

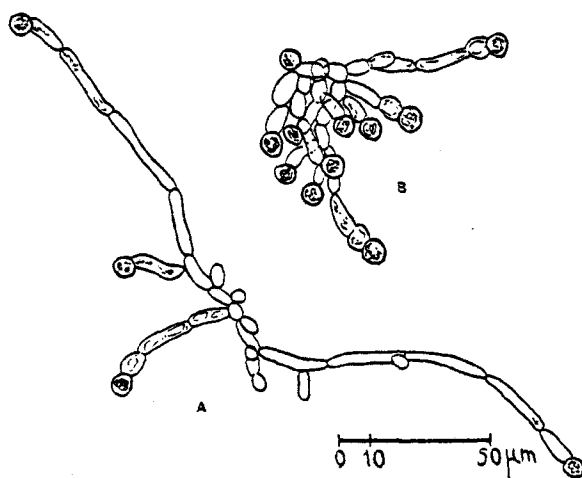
Lorsque les milieux contiennent de 2 à 5 ml de NaOH N par litre, on observe la production de nombreuses chlamydospores sur des thalles pseudomycéliens à articles courts (figure 21B) pour des densités d'ensemencement de  $10^4$  ou  $10^5$



levures/ml. On observe aussi dans ces milieux une production de levures. Celles-ci sont d'autant moins nombreuses que la concentration de glucose est plus faible ou que la concentration de NaOH est plus forte (jusqu'à 5 ml de NaOH N/l).

Figure 21 : Aspect schématique de deux thalles obtenus après 24 heures de culture à 28°C dans le milieu YNB contenant 0,1 g de glucose par litre avec des densités d'ensemencement de  $10^4$  levures/ml.

- A. milieu sans adjonction de soude (pH initial 5,5)  
 B. milieu dans lequel on a ajouté 2 ml de NaOH N/litre (pH initial 6,0).



Lorsque la densité d'ensemencement est de  $10^6$  levures/ml, on observe de rares chlamydo-spores si le milieu contient au moins 1 ml NaOH N/l pour 0,1 g de glucose/litre ou bien au moins 3 ml NaOH N/l pour 1 ou 10 g de glucose/litre.

En conclusion de cet essai, nous conseillons, si on désire employer un milieu de culture synthétique commercialisé pour la production des chlamydo-spores de *Candida albicans*, l'utilisation du milieu YNB de Difco auquel on ajoute 0,1 g de glucose par litre et 2 ml de NaOH N/litre (à ajouter après autoclavage). La densité d'ensemencement sera de préférence de  $10^4$  levures/ml sans dépasser  $10^5$  levures/ml.

2.2.2.4) Discussion et conclusion : une première remarque s'impose : il n'est pas indispensable, ni même utile de fournir des substances inhabituelles dans le milieu de culture pour obtenir des chlamydo-spores de *Candida albicans*. Un milieu de culture ordinaire est suffisant pourvu que les concentrations des divers constituants soient ajustées correctement. Nous pouvons comparer la composition de nos milieux à ceux proposés précédemment : parmi ceux-ci, le milieu de WOLIN et Coll. (124) est le plus proche du nôtre ; sa concentration d'azote est cependant relativement élevée (280 mg N/l) et il présente une déficience en sels minéraux qui peut être compensée par l'agar, ce milieu est en effet gélosé. A l'opposé, le milieu de MEINHOF et Coll. (66) ne contient que des substances exceptionnelles : du cholestérol, du tween et de l' $\alpha$ -méthyl-glucoside ; c'est un milieu gélosé et on peut se demander si les impuretés contenues dans le milieu ne sont pas les seuls constituants indispensables, car dans des essais que nous avons réalisés avec nos milieux synthétiques, la suppression du glucose ou de la source azotée ou du  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ou du  $\text{MgSO}_4$  entraîne une absence de croissance de *Candida albicans* et par conséquent une absence de production de chlamydo-spore.

Le milieu de STRIPPOLI et SIMONETTI (107) est une simple solution d'acétyl-D-glucosamine. La croissance et la production de chlamydo-spores dans ce milieu s'explique peut-être par les impuretés entraînées par l'inoculum qui n'est pas lavé ou par des substances de réserve des levuresensemencées.

DAWSON (17) a préconisé l'emploi du milieu de Czapek-Dox en précisant qu'il faut utiliser soit le milieu fabriqué par OXOID, qui contient du glycéro-phosphate de magnésium, soit un milieu fabriqué par soi-même, mais auquel on ajoute du tween 80. On retrouve la notion de substances exceptionnelles que l'on pourrait éviter en ajustant les concentrations des constituants.

Une autre remarque importante concerne l'interdépendance des facteurs : l'influence des concentrations de glucose et d'azote n'est pas la même si le pH est différent, par exemple. On retrouve ici le problème de déterminer dans un espace à 9 dimensions l'ensemble des points favorables. Il n'est pas facile, sur un nombre d'essais restreint, de tirer des règles : il était admis que la production de chlamydo-spores ne pouvait avoir lieu qu'en présence d'une concentration faible de glucose. Déjà dans l'eau de riz nous avons obtenu la chlamydo-spore dans un milieu contenant initialement 8 g de glucose par litre. Dans un milieu synthétique nous l'obtenons en présence

de 100 g de glucose par litre. Mais il faut pour cela que les concentrations des autres constituants soient en proportions convenables.

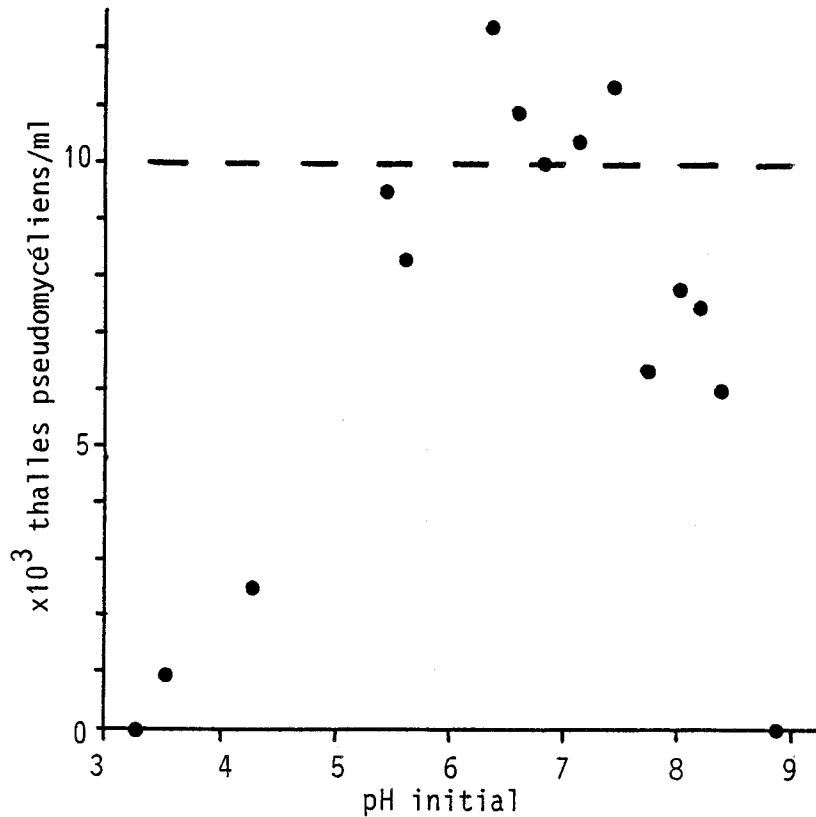
Il faut ensuite attirer l'attention sur le fait que le phénomène que nous étudions est complexe. En effet nous ensemençons des levures qui doivent d'abord se transformer en pseudomycélium puis celui-ci doit produire des chlamydo-spores. On observe très souvent en même temps une transformation pseudomycélium-levure. La production de chlamydo-spores dépendra de la proportion de levures initiales qui auront formé du pseudomycélium ; nous avons observé que cette proportion, dans certaines conditions, dépend du pH. La figure 22 indique le nombre de thalles pseudomycéliens observés dans un milieu synthétique après 24 heures de culture en fonction du pH initial du milieu (obtenus par adjonction soit de HCl N soit de NaOH N).

Le devenir de la culture dépend des conditions initiales ; l'évolution de la composition du milieu de culture se fait par diminution des concentrations de ses constituants et par l'apport de produits synthétisés par le Champignon : lesquelles de ces variations induisent-elles la formation de chlamydo-spores ? on ne peut actuellement répondre à cette question, mais on remarque que, s'il existe une substance inductrice, du type acétyl-glucosamine par exemple, le Champignon est capable de la synthétiser. Les nombreux milieux de culture proposés dans la littérature pour la formation des chlamydo-spores de *Candida albicans* permettent le passage par le ou les seuils inducteurs. Nous montrerons dans la troisième partie de cette Thèse comment la théorie des catastrophes permet d'envisager l'évolution des cultures.

Enfin on peut s'interroger sur le but et sur la méthode : si le but est de rechercher un milieu de culture synthétique favorable à la chlamydo-sporeulation, il suffit d'en trouver un et de vérifier qu'il n'est pas sensible aux petites perturbations et que par conséquent le résultat est stable. Dans ce sens, les résultats obtenus avec le milieu YNB peuvent répondre à cette attente ; l'adjonction de NaOH nous place dans les conditions de stabilité recherchées. En effet dans le milieu sans NaOH, le résultat est sensible aux petites perturbations : une seule des conditions essayées conduit à la production de chlamydo-spores et encore pas sur tous les thalles de la culture.

Si le but, au contraire, est d'analyser cette stabilité, de déterminer l'ensemble des conditions initiales favorables à la chlamydo-sporeulation, la tâche est beaucoup plus complexe. On est tout d'abord obligé de faire un

Figure 22 : Influence du pH initial sur la transformation levure  $\rightarrow$  pseudomycélium.



Nombre de thalles pseudomycéliens observés par ml de milieu après 24 heures de culture à 28°C en fonction du pH initial du milieu.

Composition du milieu : glucose : 0,1 g/l ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  : 7,5 g/l ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 1 g/l ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,2 g/l ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : 0,05 g/l ;  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  : 0,002 g/l ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,001 g/l ; Biotine : 2,5  $\mu\text{g/l}$ .

Les pH sont obtenus par adjonction de HCl N ou de NaOH N. Les cultures sontensemencées à l'aide de  $10^4$  levures/ml provenant d'une culture de 24 heures à 37°C sur milieu de Sabouraud gélosé. A pH 3,25 le développement se fait sous forme de levures uniquement, à pH 8,9 on n'observe aucune croissance.

----- : indique le nombre de thalles pseudomycéliens attendu (correspondant au nombre de levuresensemencées).

certain nombre de choix qualitatifs. On est ensuite contraint de limiter l'étude quantitative à certains paramètres et par conséquent de fixer les autres ; par exemple on peut se limiter aux constituants du milieu. Pour que l'étude ne soit pas trop schématique, il ne faut pas trop se limiter : par exemple l'étude de l'influence des concentrations de glucose et d'azote conduit à des résultats très différents si elle est faite à différents pH. L'étude de l'ensemble des conditions favorables à la chlamydosporulation dans un espace de suffisamment grande dimension est longue et difficile. Nous avons abordé l'exploration d'un tel espace à l'aide de sections planes parallèles à des paires d'axes de coordonnées ; c'est une méthode simple et classique mais extrêmement longue si on veut que l'exploration soit assez complète. Pour l'instant nous ne sommes pas allés bien loin et on peut poser la question : cela vaut-il la peine de pousser plus loin ce genre d'étude ? Cela nous permettra-t-il de comprendre pourquoi en choisissant des conditions initiales à l'intérieur d'un certain (ou de certains) domaine on obtient des chlamydospores de manière reproductible (insensible aux petites perturbations) ?

La théorie des catastrophes nous proposera un modèle de l'évolution des cultures et donnera un sens à ce domaine stable des conditions initiales.

### II.3 DÉROULEMENT DE LA MORPHOGENÈSE

Nous l'avons dit à plusieurs reprises, lorsqu'on ensemence, à l'aide de levures de *C. albicans*, des milieux de culture en vue d'obtenir des chlamydospores, on observe d'abord une croissance sous forme de pseudomycélium. Nous avons voulu préciser le déroulement de la morphogénèse. Nous avons d'abord cherché à savoir si on pouvait mettre en évidence un stade d'aptitude : nous appelons ainsi un stade à partir duquel des thalles ne portant pas encore de chlamydospores en produisent lorsqu'ils sont transférés dans l'eau.

Nous avons ensuite cherché à préciser, par rapport à ce jalon, l'influence inhibitrice de la lumière mise en évidence par ANDRIEU et Coll. (1, 2). Nous avons aussi montré une relation entre densité d'ensemencement et durée de culture nécessaire pour atteindre le stade d'aptitude.

### 2.3.1. METHODES.

a) cultures : cette étude a été réalisée dans le milieu "eau de riz glucosée" (0,25 g de glucose par litre) décrit précédemment. Nous le nommerons par la suite ER-G.

On effectue les cultures dans des fioles de Legroux, contenant 10 ml de milieu ER-Gensemencés à l'aide de levures provenant de 2 cultures successives de 24 heures à 37°C sur milieu de Sabouraud gélosé. Sauf indication contraire, la densité d'ensemencement est de  $10^4$  levures/ml, et les fioles sont incubées à 28°C.

b) éclairage : lorsque des cultures reçoivent un stimulus lumineux, celui-ci est donné par deux tubes fluorescents "blanc brillant de luxe" de 40 W placés à 10 cm au-dessus des fioles (1) ; selon cette référence (1) cet éclairage correspond à 4 000 lux environ.

c) transferts : certaines cultures sont effectuées en ER-G puis transférées au temps t (exprimé en h), soit dans l'eau déminéralisée, soit dans du milieu de Sabouraud liquide (glucose pur 20 g/l, néopeptone Difco 10 g/l).

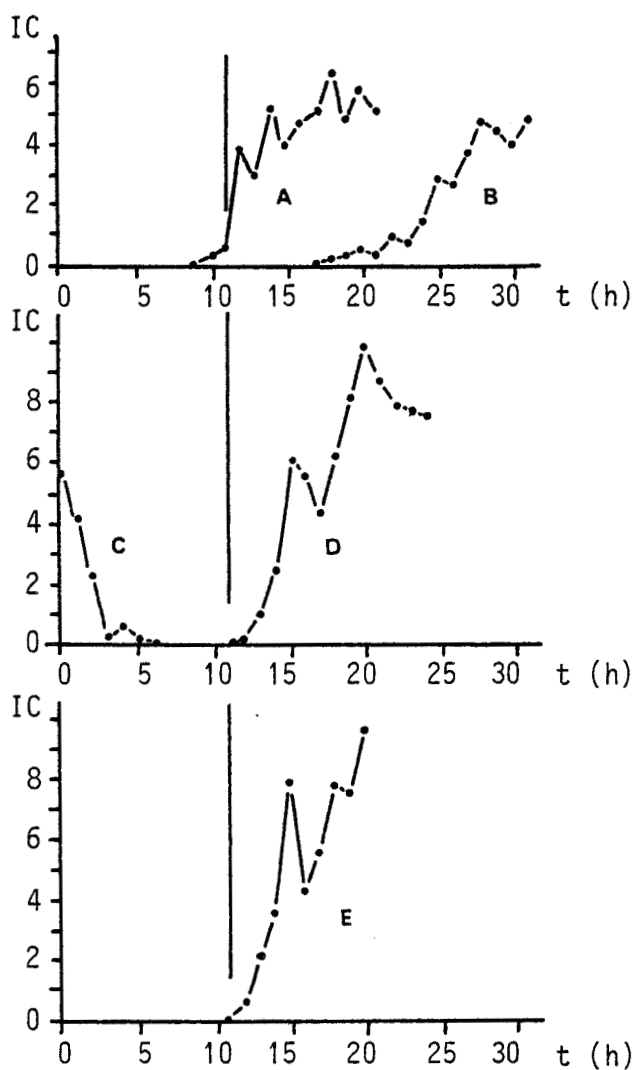
Pour ce faire, au temps t, le contenu d'une fiole est centrifugé à 2 500 g pendant 5 mn. Le culot est lavé une fois dans l'eau déminéralisée et repris dans 10 ml d'eau déminéralisée ou de milieu de Sabouraud et placé dans une nouvelle fiole de Legroux. L'incubation est continuée à 28°C.

d) mesure des résultats : le nombre de chlamydozoaires est estimé à l'aide de l'indice de chlamydozoaire (IC) ou déterminé par comptage dans une cellule de Nageotte.

### 2.3.2. ETAPES DE LA MORPHOGENESE.

a) morphologie au cours du développement : nous avons observé d'heure en heure les thalles obtenus à l'obscurité à partir d'un inoculum de  $10^4$  blastozoaires/ml en ER-G. Le décompte du nombre de cellules (chaque petit bourgeon étant compté pour une cellule) par thalle montre qu'après un temps de latence d'environ 1 h

Figure 23 : Les étapes de la morphogénèse de *Candida albicans*.



Indices de chlamydosporulation (IC) de *Candida albicans* cultivé en ER-G.

A = jusqu'au temps t ; puis les thalles sont transférés dans de l'eau

B = jusqu'au temps t ; puis les thalles sont transférés dans du milieu de Sabouraud liquide

C = durant 24 heures ; la culture est éclairée du début de l'expérience jusqu'au temps t

D = durant 24 heures ; la culture est éclairée à partir du temps t et jusqu'à 24 heures

E = durant 24 heures ; la culture est éclairée pendant 4 heures à partir du temps t

A et B = IC mesurés à t = 48 heures ; C,D et E = IC mesurés à t = 24 heures.

Les résultats présentés sur cette figure ont été obtenus dans une même série expérimentale. La ligne verticale à t = 11 h indique le pied de la courbe A et correspond au stade d'aptitude.

les cellules se divisent en un temps de génération très légèrement supérieur à 2 heures. Il se forme ainsi des thalles pseudomycéliens dont chaque cellule continue à se diviser. Après 12 heures de culture, les extrémités des rameaux pseudomycéliens se renflent légèrement et leur contenu devient granuleux. Une heure plus tard, les protochlamydo-spores apparaissent ; et après 15 heures de culture, les chlamydo-spores sont formées ; l'aspect des thalles ne se modifie plus par la suite.

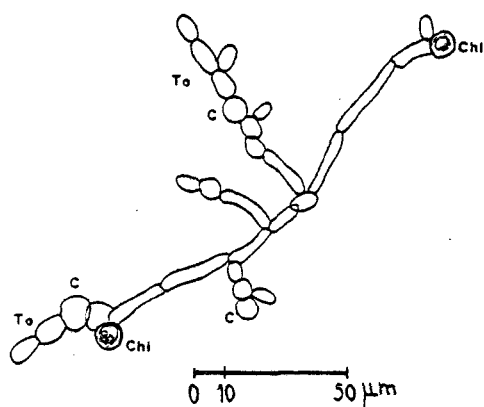
b) transfert dans l'eau : des cultures effectuées dans les mêmes conditions que précédemment sont transférées dans l'eau déminéralisée au temps  $t$ , et les IC déterminés 48 heures après le début de l'expérience. La courbe "A" de la figure 23 indique les résultats obtenus : les thalles qui ont subi un transfert avant le temps 10 ne portent aucune chlamydo-spore ; leur développement ne s'est pas poursuivi dans l'eau, tout au plus certains articles ont produit une levure. Entre 10 et 12 heures de culture, de rares chlamydo-spores surviennent après le transfert ; à partir de l'heure 12, le transfert dans l'eau est suivi de la production de nombreuses chlamydo-spores, ce que traduit la brutale ascension de la courbe A de la figure 23. Les cellules à contenu granuleux observées à la 12<sup>ème</sup> heure de culture en ER-G sont donc capables de poursuivre leur évolution dans l'eau pure. Elles se transforment en protochlamydo-spores qui, par bourgeonnement, donnent des chlamydo-spores.

c) transfert dans le milieu de Sabouraud liquide : l'expérience est conduite comme la précédente avec transfert au temps  $t$  cette fois dans le milieu de Sabouraud, et détermination d'IC après 48 heures de culture. Les résultats sont indiqués par la courbe B de la figure 23. Dans le milieu de Sabouraud les thalles pseudomycéliens bourgeonnent des levures, qui bourgeonnent à leur tour. Les IC ne tiennent pas compte de ces levures. Les thalles pseudomycéliens transférés dans le milieu de Sabouraud avant  $t = 20$  heures ne portent pas ou pratiquement pas de chlamydo-spores. Cependant, pour  $t > 15$ , avant le transfert, ces mêmes thalles en portaient. Les jeunes chlamydo-spores transférées dans le milieu de Sabouraud sont donc capables de se différencier et de bourgeonner des chaînes de cellules en tonnelet ; elles restent reconnaissables sous forme de cellules rondes intercalaires, de plus grand diamètre que les autres cellules des thalles (figure 24). A partir de  $t = 20$  heures, les chlamydo-spores formées avant le transfert perdent progressivement leur capacité de se différencier et les IC dans le milieu de Sabouraud augmentent.



Figure 24 : Aspect schématique d'un thalle, après 48 heures de culture : les 20 premières heures dans le milieu ER-G puis dans le milieu de Sabouraud ; certaines chlamydo-spores se sont différenciées (C) et ont produit des cellules en tonnelet (To).

Chl = chlamydo-spores.



d) discussion : l'ensemencement de  $10^4$  levures/ml de *C. albicans* en ER-G conduit au développement des thalles pseudomycéliens sur lesquels on trouve des chlamydo-spores à partir de 15 heures de culture à 28°C. Cependant bien plus tôt, vers la 12ème heure de culture, les thalles ont déjà atteint un stade à partir duquel la différenciation peut se faire dans l'eau, en absence d'éléments nutritifs. Ce stade peut se comparer au "readiness" décrit pour la sporulation de *Saccharomyces cerevisiae* (99). Nous l'appellerons stade d'appétitude. D'après nos observations microscopiques, ce stade correspond morphologiquement à l'apparition des renflements granuleux des cellules apicales du pseudomycélium. L'apparition de ces granulations serait la première manifestation de la différenciation de ces cellules en protochlamydo-spore. Sans apport nutritif supplémentaire, la protochlamydo-spore produit une chlamydo-spore. La jeune chlamydo-spore est capable de bourgeonner, mais elle perd rapidement toute capacité d'évoluer dans le milieu de Sabouraud où on la place. Notre observation confirme celles de MILLER et Coll. (67), et de RAUDONIS et Coll. (84).

## 2.3.3. INFLUENCE DE LA LUMIERE.

Des fioles contenant 10 ml de milieu ER-G et  $10^4$  levures/ml sont incubées à 28°C et sont éclairées selon différentes modalités ; les IC sont déterminés après 24 heures de culture.

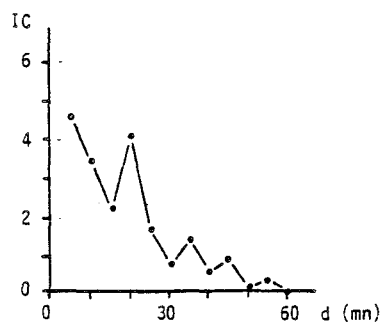
a) cultures éclairées du temps 0 au temps t puis placées à l'obscurité : les résultats sont indiqués par la courbe C de la figure 23. Un stimulus lumineux de plus de 6 heures appliqué au début de la culture inhibe complètement la chlamydosporulation ; un stimulus de 3 heures est déjà fortement inhibiteur.

b) cultures placées à l'obscurité jusqu'au temps t puis éclairées jusqu'au temps 24 : la courbe D et la figure 23 montrent que le stimulus lumineux doit débiter avant le temps 13 (h) pour être complètement inhibiteur. Si le stimulus lumineux débute plus tard, il est de moins en moins inhibiteur et peut même avoir une action légèrement stimulante.

c) cultures recevant un stimulus lumineux pendant 4 heures à partir du temps t : un stimulus lumineux durant 4 heures, débutant avant  $t = 12$  heures, est totalement ou quasi-totalement inhibiteur de la chlamydosporulation (figure 23, courbe E).

d) cultures recevant un stimulus de durée variable appliqué à partir de la 6ème heure de culture : les courbes C, D et E de la figure 23 montrent que des cultures recevant de la lumière entre la 6ème et la 10ème heure, quelles que soient les modalités d'application, ne produisent pas de chlamydo-spores. Nous avons voulu connaître la durée minimale d'un stimulus inhibiteur durant cette période : la figure 25 montre qu'un stimulus de 30 mn est fortement inhibiteur, et qu'un stimulus de 1 heure l'est complètement.

Figure 25 ; Indices de chlamydo-sporulation (IC) de *Candida albicans* cultivé dans le milieu ER-G en fonction de la durée (d) d'un stimulus lumineux débutant après 6 heures de culture.



e) discussion : nos observations de la photoinhibition de la chlamydosporulation sont en accord avec les résultats d'ANDRIEU et Coll. (1). SALTARELLI et Coll. (90) n'observent cette photoinhibition qu'avec une seule souche, mais ils utilisent des intensités lumineuses beaucoup plus faibles que les nôtres. Par rapport à ces travaux antérieurs, nous apportons des précisions supplémentaires sur les stades du développement sensibles à la lumière : pendant les premières heures de la culture, la photoinhibition n'est que partielle (figure 23C) ; un stimulus lumineux d'une durée de 30 mn est inefficace s'il débute moins de 1 heure après l'inoculation du milieu ; un tel stimulus lumineux est ensuite inhibiteur de la chlamydosporulation. On remarque donc que la lumière est inefficace durant le temps de latence de la culture mais qu'elle devient efficace dès que les levures ensemencées commencent à bourgeonner ; une expérience complémentaire confirme cela : on place les levures qui serviront à inoculer les fioles d'ER-G dans du milieu de Sabouraud contenant de l'hydroxyurée 0,1 M durant 2 heures. De cette manière les levures commencent leur cycle de division. Elles émettent un bourgeon, mais leur noyau ne se divise pas car l'hydroxyurée bloque la synthèse de l'ADN. Ces cellules bloquées en phase S de division sont récupérées par centrifugation et ensemencées en ER-G. Elles sont immédiatement sensibles à un stimulus lumineux de 30 mn. Les cultures initiées de cette manière sont synchrones (pendant les deux premiers cycles de division). Nous avons observé qu'un stimulus lumineux de 30 mn est efficace quel que soit le moment du cycle où il est appliqué. Il suffit donc, apparemment, que le métabolisme cellulaire fonctionne pour que la lumière soit inhibitrice de la chlamydosporulation.

En fait, la lumière inhibe la formation du pseudomycélium et oriente le développement dans le milieu ER-G vers la forme levure. Les levures ainsi formées continuent à se diviser sous forme de levures à l'obscurité dans leur milieu d'origine ou si elles sont transférées dans le surnageant d'une culture du même âge effectuée à l'obscurité ou même en ER-G n'ayant jamais été ensemencée auparavant. La possibilité pour ces levures de se développer sous forme de pseudomycélium ne sera restaurée qu'après culture sur milieu de Sabouraud et subculture en ER-G. Ce phénomène sera interprété au paragraphe 3.2.3.2.

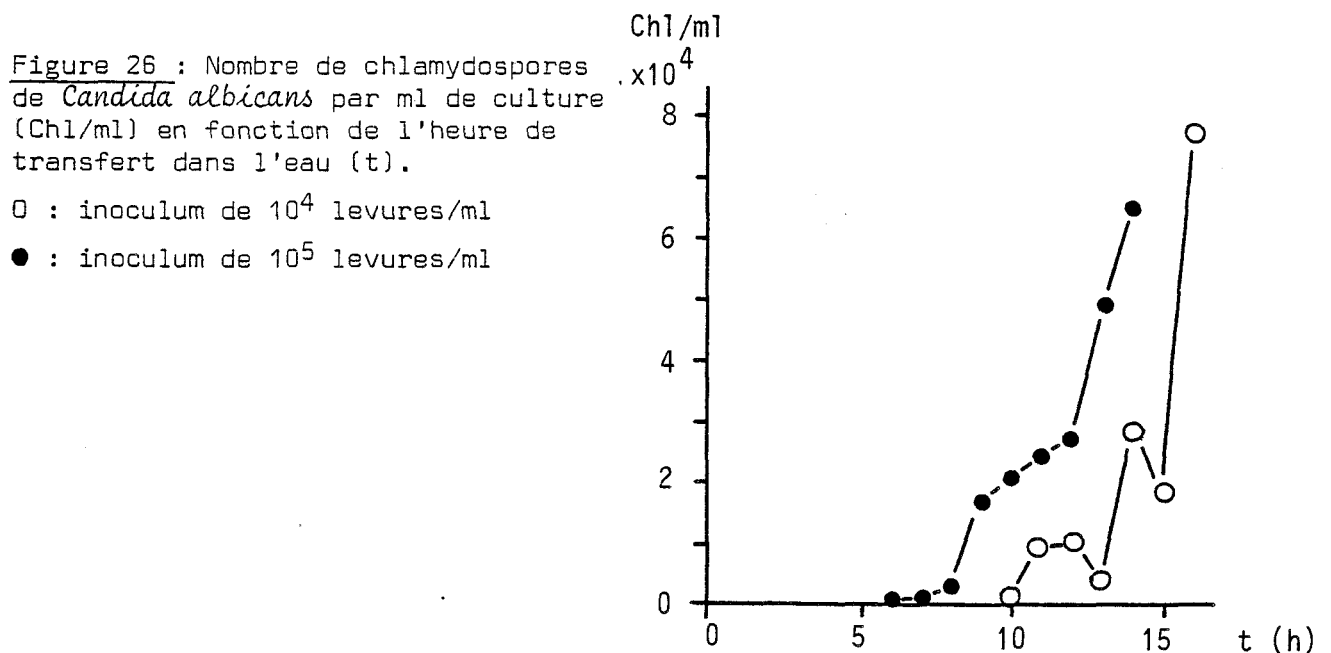
Les courbes D et E de la figure 23 sont décalées vers la droite de la courbe A de la même figure. Cela indique que les thalles qui ont passé le stade d'aptitude défini par les transferts dans l'eau, sont encore sensibles à la lumière. L'irradiation par la lumière blanche d'une protochlamydo-spore

l'empêche donc de produire une chlamyospore ; c'est ce que confirme notre insuccès lorsque nous avons voulu dessiner la formation de la chlamyospore pour la présenter sur la figure 4 ; dans les conditions rencontrées dans le faisceau lumineux du microscope les protochlamydo-spores forment du pseudo-mycélium.

Nous ne pouvons donner aucune explication pour la légère stimulation de la chlamydo-sporelisation déclenchée par la lumière après 18 ou 20 heures de culture. L'expérience a été répétée plusieurs fois et cette stimulation a été retrouvée chaque fois.

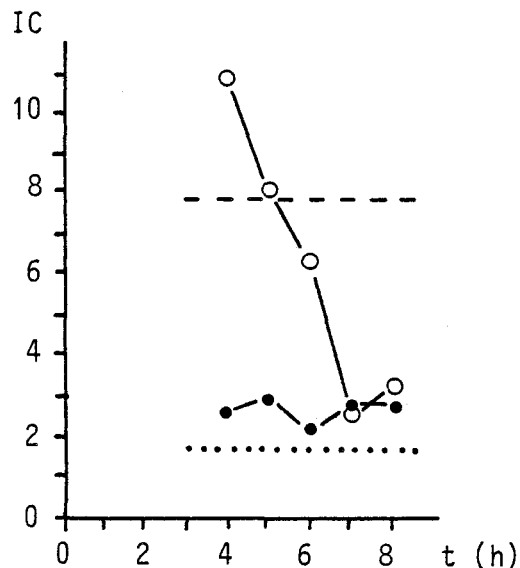
#### 2.3.4. INFLUENCE DE LA DENSITE D'ENSEMENCEMENT.

a) transfert dans l'eau : nous avons déjà montré l'influence de la densité d'ensemencement sur l'IC : lorsque la densité d'ensemencement est supérieure à  $10^4$  levures/ml, la taille des thalles de 24 heures est plus petite, IC diminue, mais le nombre de chlamydo-spores produites par ml reste constant pour les densités d'ensemencement comprises entre  $10^4$  et  $10^5$  levures/ml. Nous avons ensemencé au temps 0 des fioles contenant 10 ml de milieu ER-G à raison de  $10^4$  et  $10^5$  levures/ml ; les thalles sont ensuite transférés au temps t dans de l'eau déminéralisée, et le nombre de chlamydo-spores par ml est déterminé au temps 24. La figure 26 montre que le stade d'aptitude à la chlamydo-sporelisation apparaît plus tardivement si l'inoculum est plus faible.



b) transferts réciproques : au temps 0 de l'expérience, 2 séries de fioles sont ensemencées à raison de  $10^4$  et  $10^5$  levures par ml. Au temps t, une fiole de chaque série est centrifugée, puis les culots sont lavés une fois à l'eau déminéralisée et remis en suspension dans le milieu de culture qui n'était pas le sien. On détermine au temps 24 les IC qui sont indiqués sur la figure 27 : au temps 7 ou 8, le transfert de l'inoculum de  $10^4$  levures/ml dans le milieu qui contenait  $10^5$  levures/ml induit immédiatement la chlamydosporulation sur des thalles de petite tailles, ce qui se traduit par un IC de 2,5 à 3.

Figure 27 : IC de *C. albicans* en fonction de l'heure de transfert réciproque (t) de 2 cultures.



- = thalles obtenus à partir d'un inoculum de  $10^4$  levures/ml et transférés à t dans le milieu de culture correspondant à l'inoculum de  $10^5$  levures/ml ;
- = thalles obtenus à partir d'un inoculum de  $10^5$  levures/ml et transférés à t dans le milieu de culture correspondant à l'inoculum de  $10^4$  levures/ml ;
- = valeur de l'IC d'une culture à partir d'un inoculum de  $10^4$  levures/ml non transférée ;
- ... = valeur de l'IC d'une culture à partir d'un inoculum de  $10^5$  levures/ml non transférée.

c) discussion : lorsqu'on ensemence  $10^4$  ou  $10^5$  levures/ml, le développement des thalles, durant les premières heures, est identique et il est impossible de distinguer après 6 heures de culture les thalles issus de ces deux types de culture. Cependant le stade d'aptitude est atteint d'autant plus rapidement que l'inoculum est plus dense. En l'absence de transfert, si l'inoculum est

dense, les chlamydo-spores sont produites sur des thalles plus petits et l'IC est plus faible.

L'expérience de transfert réciproque semble indiquer que c'est la composition du milieu de culture à un moment donné qui amène certaines cellules du thalle (en effet, toutes les cellules du thalle ne produisent pas des chlamydo-spores) au stade d'aptitude qui conduira à la formation des chlamydo-spores. La composition du milieu de culture varie par épuisement des éléments nutritifs et par enrichissement en produits de métabolisme excrétés par le Champignon. Il ne nous est pas possible d'indiquer la nature du stimulus efficace. Toutefois dans l'hypothèse d'une induction par épuisement des éléments nutritifs, le seuil devrait correspondre à une concentration non nulle d'au moins l'un des constituants puisque le simple transfert dans l'eau qui correspond à la disparition totale de tous les éléments nutritifs ne déclenche pas la chlamydo-sporeulation.

#### 2.3.5. CONCLUSION.

L'étude du déroulement de la morphogénèse au cours de la chlamydo-sporeulation de *C. albicans* nous a permis de mettre en évidence un stade d'aptitude qui peut servir de point de repère. Après le stade d'aptitude, la culture est encore capable de s'orienter dans une autre voie que celle de la chlamydo-sporeulation, par exemple si on lui applique un stimulus lumineux ou si on la transfère dans du milieu de Sabouraud.

## II.4 PHÉNOMÈNES RESPIRATOIRES ET PRODUCTION DES CHLAMYDOSPORES

Nous présenterons dans ce paragraphe des faits qui évoquent plus ou moins directement l'intervention des phénomènes respiratoires dans le déroulement de la morphogénèse : levure → pseudomycélium → chlamydo-spores.

Il est classique de dire que la chlamydo-sporeulation de *C. albicans* se produit en semi-anaérobiose que l'on crée habituellement en recouvrant

l'inoculum d'une lamelle. Cette idée semble si bien assurée que nous avons pensé, avant d'entreprendre notre étude, produire les chlamydo-spores dans une veine liquide placée entre deux lames de verre. Cependant à cause de la complication que représentait un tel dispositif, nous avons tenté des cultures en fioles qui nous ont donné satisfaction. Sur les milieux gélosés classiques, nous obtenions des chlamydo-spores aussi bien sous la lamelle qu'à l'extérieur. Mais il n'est pas possible de mettre en doute les travaux anciens et il fallait trouver la cause de notre désaccord.

#### 2.4.1. INFLUENCE DE LA LAMELLE.

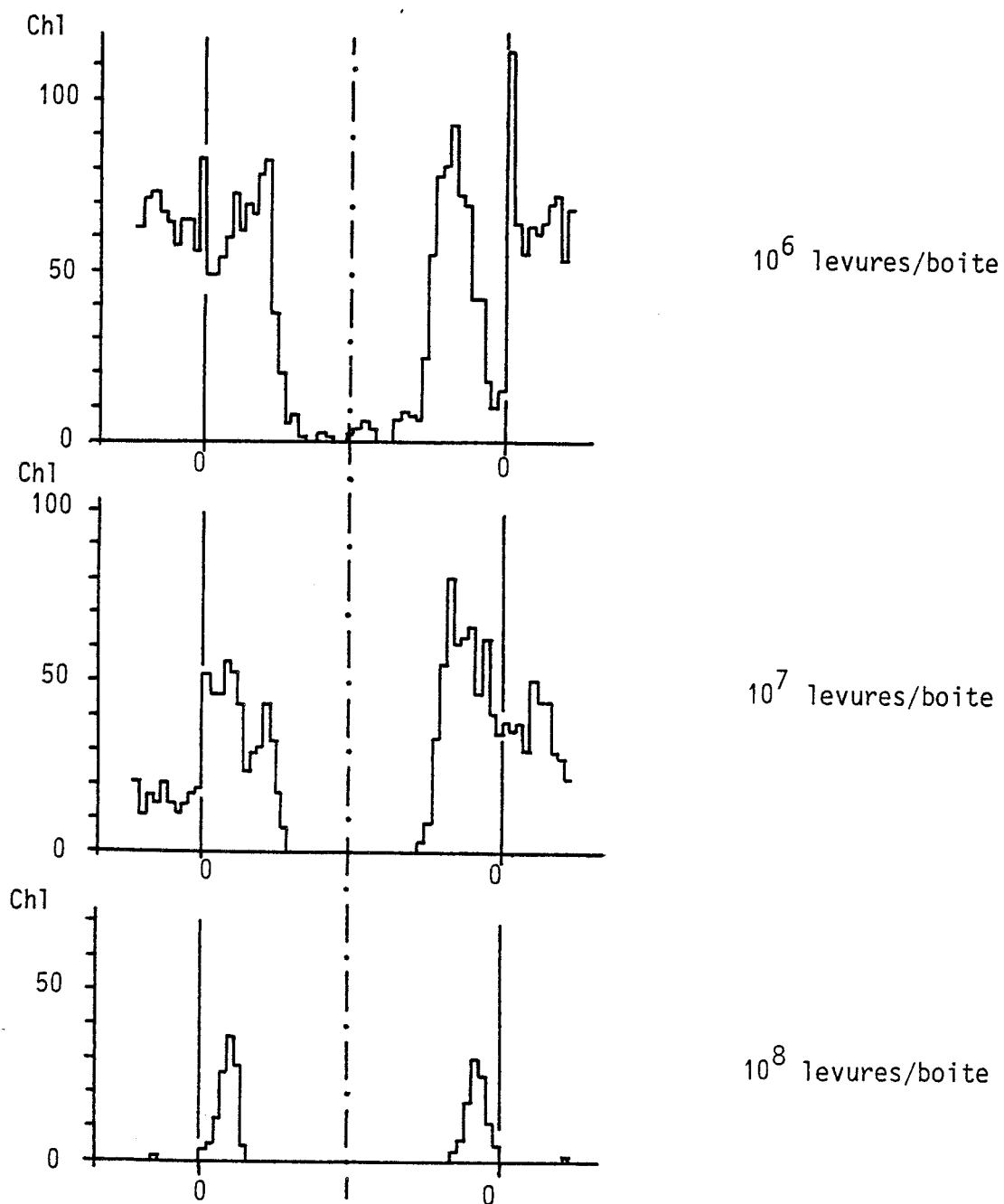
Nous avons entrepris de déterminer le nombre de chlamydo-spores par unité de surface, sur milieu gélosé, le long d'un trajet passant sous une lamelle. La densité d'ensemencement étant une condition importante de la chlamydo-sporeulation, nous avons fait nos mesures avec des inoculums plus ou moins denses.

Les cultures sont effectuées dans des boîtes de Pétri de 8 cm de diamètre intérieur contenant 25 ml de milieu Riz-Agar-Tween. On étale sur toute la surface de la boîte 1 ml de suspension contenant  $10^6$ ,  $10^7$  ou  $10^8$  levures issues d'une culture de 24 heures à 37°C sur milieu de Sabouraud gélosé. Nous déposons ensuite au centre de la boîte une lamelle de 22 x 32 mm, flambée. Après 24 heures d'incubation à 28°C, à l'obscurité, nous déterminons le nombre de chlamydo-spores dans une bande de 0,5 mm de côté, passant sous la lamelle et débordant de 5 mm de chaque côté. Cette bande est divisée en carrés de 0,5 mm de côté pour la numération. Pour la réalisation de ces mesures nous observons, à l'aide d'une chambre claire, la culture et un quadrillage étalonné.

La figure 28 présente les histogrammes obtenus : signalons d'abord les artéfacts en bordure de la lamelle. Lors du dépôt de celle-ci, on chasse une partie de l'inoculum le long d'une ligne ce qui perturbe les résultats. Néanmoins, grâce à la symétrie du dispositif il est possible de corriger ces erreurs.

Il faut ensuite faire plusieurs remarques :

Figure 28 : Influence d'une lamelle recouvrant la culture sur la production des chlamydo-spores de *Candida albicans* cultivé sur milieu Riz-Agar-Tween dans des boîtes de Pétri de 8 cm de diamètre.



Les histogrammes indiquent le nombre de chlamydo-spores (Ch1) par carré de 0,5 mm de côté le long d'une bande passant sous la lamelle. Différentes densités d'ensemencement ont été utilisées.

Les "0" indiquent les bords de la lamelle, et sont distants de 22 mm.





- a) les résultats sont différents selon la densité d'ensemencement ;
- b) on observe des frontières nettes entre zones avec et sans chlamydozoaires. Nous avons constaté que ces frontières se déplacent ; en effet si l'on observe les cultures après 48 heures au lieu de 24 heures, les chlamydozoaires sont aussi nombreuses d'un bord à l'autre de la lamelle pour les densités d'ensemencement de  $10^6$  et  $10^7$  levures/boîte. Le déplacement de frontière dans le phénomène de chlamydozopulation de *Candida albicans* a été observé et mentionné par ASCHNER dès 1958 (4). Personne depuis, à notre connaissance, ne s'est intéressé à ce phénomène. Nous montrerons que la théorie des catastrophes peut l'interpréter (paragraphe 3.2.2) ;
- c) les résultats obtenus avec la densité d'ensemencement la plus forte ( $10^8$  levures/boîte) correspondent à ce qui est dit classiquement : les chlamydozoaires apparaissent sous la lamelle, près du bord. Pour les plus faibles densités d'ensemencement, on observe des chlamydozoaires en dehors de la lamelle.  $10^8$  levures par boîte correspondent à  $4 \times 10^6$  levures par ml de milieu et effectivement, dans ces conditions, nous n'obtenons pas de chlamydozoaires dans nos milieux liquides. Il y a une interdépendance de la densité d'ensemencement et de l'anaérobiose et cela explique notre désaccord initial.

BAKERSPIGEL (6) avait fait une remarque dans ce sens : il est fréquent d'ensemencer en stries pour produire les chlamydozoaires de *C. albicans* ; BAKERSPIGEL observe que, selon lui, les chlamydozoaires apparaissent en bordure de la strie sous la lamelle, alors que selon ASCHNER (4) qu'il cite, elles apparaissent au milieu de la strie. Nous pouvons supposer que BAKERSPIGEL "a la main plus lourde" qu'ASCHNER si bien que la densité cellulaire au milieu de la strie est trop élevée et que les chlamydozoaires ne peuvent pas s'y former.

Le dépôt d'une lamelle sur l'inoculum a donc bien une influence sur la chlamydozopulation : pour les fortes densités d'ensemencement il permet l'obtention de chlamydozoaires alors que sans lamelle on n'en observerait pas. Pour les faibles densités d'ensemencement l'effet est plus discret, puisqu'il se manifeste par un déplacement de frontière. Dans ce cas les chlamydozoaires apparaissent d'autant plus rapidement que le thalle qui la produit se trouve plus près du bord sous la lamelle. La distance sous la lamelle intervient sur le déroulement de la morphogénèse.

Le dépôt de la lamelle crée un ou des gradients. Tous les auteurs qui se sont intéressés à la chlamydozopulation de *C. albicans* supposent qu'il s'agit d'un gradient d'anaérobiose d'où l'expression semi-anaérobiose pour désigner la région près du bord sous la lamelle. Il faut cependant employer cette expression avec prudence.

#### 2.4.2. INFLUENCE D'INHIBITEURS RESPIRATOIRES : ANTIMYCINE A ET ACIDE SALICYL-HYDROXAMIQUE.

Il existe chez *Candida albicans*, comme chez de nombreux organismes, une voie respiratoire insensible à l'antimycine A et au cyanure (55, 96). Cette voie est habituellement réprimée, mais elle se met à fonctionner avec un temps de latence de 10 minutes si on ajoute dans le milieu de culture de l'antimycine A ou du cyanure. Cette voie accessoire peut, elle-même, être inhibée par l'acide salicyl-hydroxamique (SHAM).

Les expériences avec ou sans lamelle font soupçonner l'intervention des phénomènes respiratoires dans le déroulement de la morphogénèse que nous étudions et il est intéressant d'étudier le rôle éventuel de ces voies respiratoires.

Les essais ont été réalisés dans le milieu "eau de riz glucosée à 0,25 g/l" (ER-G). Les fioles de Legroux contenant 10 ml de milieu sont ensemencées à l'aide de  $10^6$  levures ( $10^5$  levures/ml) issues d'une culture de 24 heures à 37°C sur milieu de Sabouraud gélosé ; les cultures sont incubées à 28°C à l'obscurité. Nous avons utilisé la densité d'ensemencement de  $10^5$  levures/ml afin d'atteindre plus rapidement le stade d'aptitude. Les cultures sont comparées en utilisant le nombre de chlamydo-spores produites par ml de milieu, déterminé par comptage en cellule de Nageotte.

Les inhibiteurs, antimycine A et SHAM, sont ajoutés dans les milieux, en solution dans du méthanol : 0,2 ml de solution méthanolique dans 10 ml de milieu ou 10 ml d'eau dans le cas des transferts. Des témoins recevant 0,2 ml de méthanol dans 10 ml de milieu ou d'eau ont été réalisés.

Voici les résultats d'un premier essai :

Conditions de culture	Nombre de chlamydo-spores/ml après 24 heures de culture
ER-G (témoin)	$2,47 \times 10^5$
ER-G + méthanol (témoin)	$2,41 \times 10^5$
ER-G + antimycine A 9 $\mu$ M	0
ER-G + SHAM 3,5 mM	$2,40 \times 10^3$
ER-G + antimycine A 9 $\mu$ M + SHAM 3,5 mM	0

Le méthanol ajouté dans les cultures n'a pas d'effet sur la chlamydosporulation. L'antimycine A est totalement inhibitrice ; en sa présence, il se forme des thalles "amas de levures" et rarement des rameaux pseudomycéliens. En présence de SHAM, l'inoculum commence son développement normale-ment ; nous observons après 24 heures de culture des thalles pseudomycéliens, mais ceux-ci portent rarement des chlamydo-spores (100 fois moins que sur les témoins). Il ne s'agit pas d'un simple retard, car après 48 heures de culture le résultat est inchangé.

La figure 29 indique l'influence de la concentration du SHAM. Ce composé est complètement inhibiteur de la chlamydosporulation pour les concentrations supérieures ou égales à 7 mM ; cependant le développement des thalles est toujours pseudomycélien, même en présence de SHAM 14 mM.

Figure 29 : Influence de la concentration de l'acide salicyl-hydroxamique (SHAM) ajouté dans le milieu eau de riz glucosée à 0,25 g/l sur le nombre de chlamydo-spores (chl/ml) produites

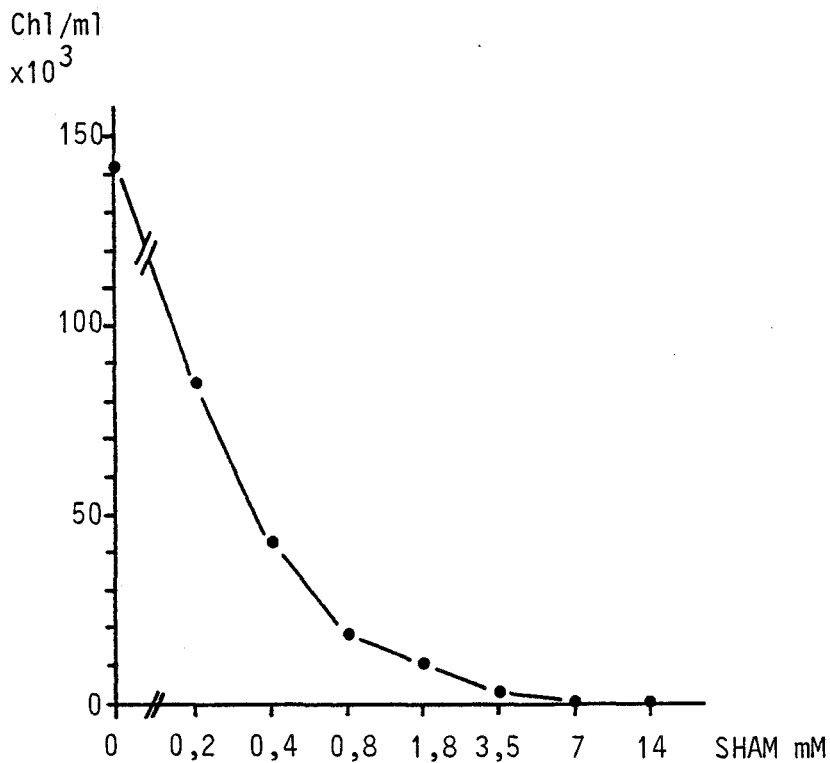


Figure 30 : Nombre de chlamydozoaires par ml (chl/ml) en fonction de l'heure (t) de transfert des thalles dans l'eau ●-●, ou de l'heure (t) à laquelle on ajoute dans les cultures de l'antimycine A (0 μM final) ▲-▲, du SHAM (3,5 mM final) □-□, ou du méthanol (témoin) ▽-▽.

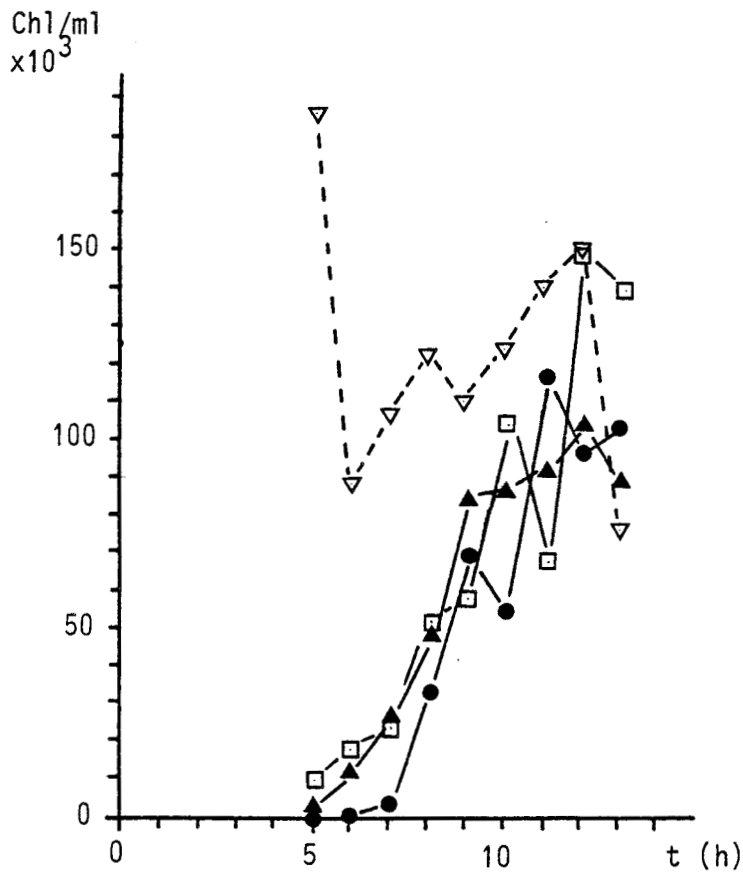
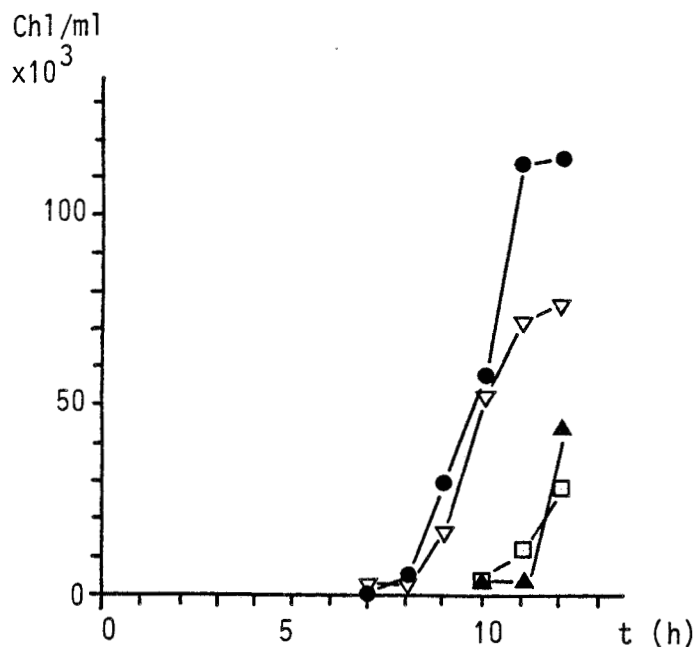


Figure 31 : Nombre de chlamydozoaires par ml (chl/ml) en fonction de l'heure (t) de transfert dans des thalles dans l'eau (détermine le stade d'aptitude) ●-● ou l'eau + méthanol ▽-▽ ou l'eau + antimycine ▲-▲ ou l'eau + acide salicyl-hydroxamique □-□.



Nous avons également étudié l'influence de l'antimycine A et du SHAM en fonction du déroulement de la morphogénèse en utilisant comme point de repère le stade d'aptitude défini précédemment. Dans un essai, nous avons ajouté dans les fioles, après une durée de culture variable, de l'antimycine A (9  $\mu\text{M}$  final), du SHAM (3,5 mM final) ou du méthanol ; en même temps les thalles d'une fiole étaient transférés dans l'eau. Les résultats obtenus (figure 30) montrent que les inhibiteurs doivent être ajoutés avant le stade d'aptitude pour inhiber la formation des chlamydospores.

Dans un autre essai, les thalles ont été transférés après une durée de culture variable dans de l'eau, ou de l'eau + antimycine A 9  $\mu\text{M}$  ou de l'eau + SHAM 3,5 mM ou de l'eau + méthanol. La figure 31 indique que, dans ces conditions de transfert, les thalles sont encore sensibles aux inhibiteurs après le stade d'aptitude, ce qui semble contradictoire avec les résultats précédents ; les inhibiteurs n'agissent pas de la même manière en présence du milieu de culture qu'en présence d'eau.

L'ensemble de ces résultats montre que la voie respiratoire sensible à l'antimycine A est indispensable au développement sous forme pseudomycélium. L'action de l'antimycine A est semblable à celle de la lumière, c'est une orientation vers un développement levures groupées en amas. L'influence du SHAM est plus inattendue et plus intéressante. En effet, selon SHEPHERD et Coll. (96) on ne connaît pas le rôle de la voie insensible à l'antimycine. Il semble qu'elle intervienne dans le phénomène de chlamydosporulation, mais nos expériences ne sont pas suffisantes pour préciser selon quelles modalités ; cependant, on peut affirmer que le SHAM n'empêche pas la formation du pseudomycélium et intervient donc sur la transformation pseudomycélium  $\rightarrow$  chlamydospore.

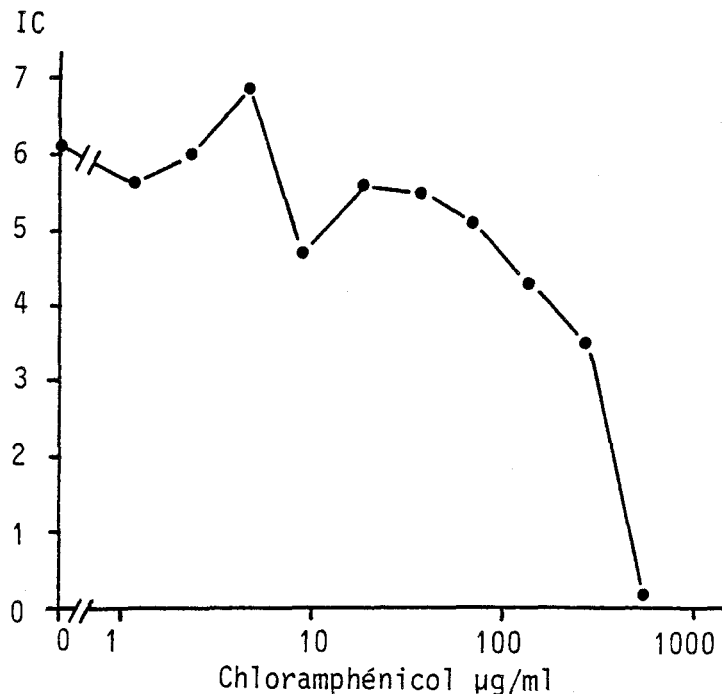
#### 2.4.3. INFLUENCE DU CHLORAMPHENICOL.

Chez les eucaryotes, le chloramphénicol est un inhibiteur de la synthèse des protéines mitochondriales. Nous avons mis en évidence son action inhibitrice sur la chlamydosporulation de *Candida albicans*.

Les chlamydospores sont produites en ensemençant  $10^4$  levures/ml dans 10 ml de milieu eau de riz glucosée à 0,25 g/l contenant différentes

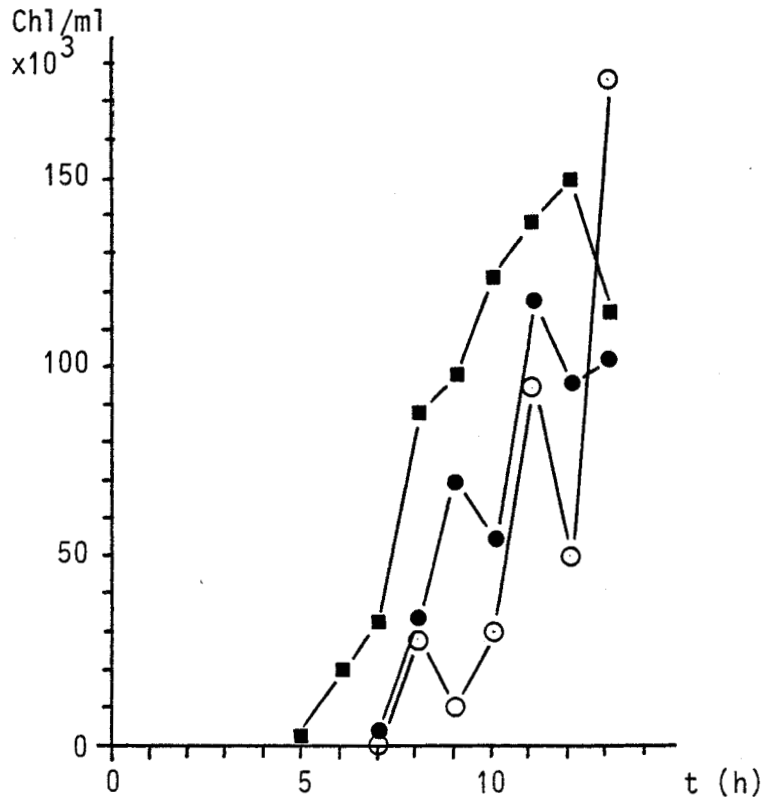
concentrations de chloramphénicol. L'essai est conduit en fioles de Legroux incubées 24 heures à 28°C à l'obscurité. L'inoculum est obtenu par culture de 24 heures à 37°C sur milieu de Sabouraud gélosé. L'indice de chlamydo- sporulation permet d'apprécier l'inhibition. La figure 32 montre que le chloramphé- nicol à la concentration de 600 µg/ml inhibe presque totalement la chlamydo- sporulation. L'examen des cultures montre de plus que, pour cette concentration d'antibiotique, le développement de *Candida albicans* se fait sous forme de levures et non de pseudomycélium.

Figure 32 : Indices de chlamydo- sporulation (IC) de *Candida albi- cans* cultivé 24 heures à 28°C à l'obscurité dans de l'eau de riz glucosée à 0,25 g/l, en fonction de la concentration de chloram- phénicol ajouté dans le milieu.



Nous avons aussi cherché à quel stade du développement agit le chloramphénicol : pour cela des thalles sont transférés après une durée de culture variable soit dans de l'eau, soit dans une solution aqueuse de chlo- ramphénicol (1 g/l) ; nous avons, dans le même essai, ajouté après une du- rée variable de culture du chloramphénicol dans les fioles d'une série (con- centration finale de chloramphénicol : 1 g/l). L'expérience de transfert montre que le chloramphénicol n'est pas inhibiteur après le stade d'aptitude (figure 33). Le chloramphénicol est actif s'il est ajouté dans les cultures au plus tard une heure avant le stade d'aptitude.

Figure 33 : Nombre de chlamydo-spores par ml (chl/ml) en fonction de l'heure (t) :



- : de transfert des thalles dans l'eau
- : de transfert des thalles dans une solution aqueuse de chloramphénicol (1 g/l)
- : à laquelle on ajoute du chloramphénicol (1 g/l) dans la culture.

Il faut enfin signaler que certains auteurs (11, 31) utilisent le chloramphénicol comme antibiotique antibactérien dans des milieux de chlamydo-sporulation de *Candida albicans*. Ils utilisent une concentration de 250 µg/ml qui n'est pas inhibitrice. Nos résultats devraient cependant faire abandonner cet antibiotique lorsqu'on veut obtenir des chlamydo-spores.

#### 2.4.4. DISCUSSION.

La discussion de l'importance des phénomènes respiratoires sur le déroulement de la morphogénèse conduisant à la production des chlamydo-spores de *Candida albicans* doit tenir compte des travaux de ANDRIEU et Coll. (1) sur

la photoinhibition de la chlamydosporulation. Ces auteurs ont en effet montré la concordance du spectre d'action de la lumière avec le spectre d'absorption de la levure pour la radiation de 414 nm. Ils constatent également que "si l'on compare l'allure de la réponse biologique de *Candida albicans* à l'action de la lumière avec le spectre d'action décrit chez *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la photoinhibition de l'adaptation respiratoire (42) on peut envisager une réponse similaire et émettre l'hypothèse de l'inhibition de cytochromes et en particulier de l'inhibition de la synthèse de la protoporphyrine".

Il nous faut aussi bien distinguer les étapes de la morphogénèse conduisant à la production des chlamydospores et repérer à quelle(s) étape(s) interviennent les différents facteurs ou substances inhibitrices étudiées : ces étapes sont les suivantes :

- a) transformation de la forme levure ensemencée en forme pseudomycélium ;
- b) croissance sous forme pseudomycélium ;
- c) production des protochlamydospores et des chlamydospores par le pseudomycélium.

La lumière est inhibitrice au cours de ces trois étapes. Il faut de plus souligner deux faits :

- 1) si on éclaire des levures en phase de croissance dans le milieu de Sabouraud et qu'on utilise ces levures pour ensemercer du milieu ER-G incubé ensuite à l'obscurité, on obtient des chlamydospores ;
- 2) une culture en milieu ER-G éclairée est orientée vers la levure. Si on utilise ces levures pour ensemercer de nouvelles fioles d'ER-G placées à l'obscurité le développement se poursuit sous forme levure. Mais on pourra restaurer la possibilité pour ce type de levure de se transformer en pseudomycélium par culture dans du milieu de Sabouraud et subculture dans du milieu ER-G à l'obscurité. Par conséquent une levure obtenue sur milieu de Sabouraud éclairé ou non est différente d'une levure obtenue sur milieu ER-G éclairé. Ces levures ont donc une mémoire et on observe une sorte de phénomène d'hystérésis ; il ne suffit pas de cesser l'éclairement pour revenir en arrière et obtenir du pseudomycélium, et pourtant les levures "ER-G éclairées" n'ont pas perdu leur capacité de se transformer en pseudomycélium mais elles doivent repasser par le type levure "Sabouraud". Nous verrons que la théorie des catastrophes permet de donner une interprétation de l'ensemble de ces faits (paragraphe 3.2.3.2).

L'antimycine A est inhibitrice également au cours des trois étapes et son action se manifeste de la même manière que celle de la lumière.

JEREBZOFF-QUINTIN et Coll. (50) notent également que l'antimycine A peut remplacer l'action de la lumière pour stimuler la caroténogénèse chez *Leptosphaeria michotii* et que dans ce système le photorécepteur comporterait plusieurs porphyrines.



L'action de l'acide salicyl-hydroxamique est intéressante car elle semble indiquer que la voie respiratoire secondaire, insensible à l'antimycine A, fonctionne au moins à partir du stade d'aptitude et qu'elle est indispensable à la formation des chlamydospores.

L'influence des phénomènes respiratoires et de la synthèse des protéines mitochondriales sur la transformation levure → mycélium a été étudiée chez les mucorales (78, 92, 137) et chez deux espèces d'*Endomycopsis* (33, 125). L'antimycine A et le chloramphénicol orientent la morphologie de ces Champignons vers la forme levure, ce qui correspond à nos observations bien que, dans nos expériences, la forme obtenue en absence d'inhibiteur soit du pseudomycélium et non du mycélium.

L'influence de la lamelle dépend de la densité d'ensemencement et cette interdépendance des facteurs est très intéressante : elle explique les résultats contradictoires dont la littérature est remplie, et elle devrait susciter davantage l'intérêt des chercheurs. C'est un fait tellement banal (l'eau bout à une température différente selon la pression qu'elle subit, par exemple) qu'on n'y prête plus guère attention. Comment expliquer l'interdépendance de facteurs comme la densité d'ensemencement, l'"anaérobiose", la concentration de glucose et le pH ? On pourrait bien dire que plus les cellules sont nombreuses et plus elles consomment d'oxygène et donc plus elles provoquent une anaérobiose : densité d'ensemencement et anaérobiose devraient agir dans le même sens et on devrait pouvoir remplacer la lamelle par une plus forte densité d'ensemencement, on observe malheureusement le phénomène inverse. Les choses ne sont pas si simples et encore une fois la théorie des catastrophes peut venir à notre secours.

## II.5 CONCLUSION

Les phénomènes morphogénétiques en culture sont sensibles aux conditions initiales. L'étude des conditions de culture conduisant à la production d'une certaine forme, la chlamydospore chez *Candida albicans* en ce qui concerne ce travail, nécessite donc l'exploration d'un espace multidimensionnel dans

lequel sont repérées les conditions initiales. Certaines régions de cet espace sont stables, c'est à dire conduisent toujours à la même forme malgré de petites perturbations. D'autres régions sont instables ; les expériences réalisées à partir de ces régions ne sont pas reproductibles.

Nous avons montré que la chlamydosporulation de *Candida albicans* est sensible à la densité d'ensemencement, à la préparation des cellules de l'inoculum (conditions de préculture), à la concentration des constituants du milieu, en particulier glucose,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et NaOH, aux conditions d'aérobiose. Nous avons aussi montré qu'aucune substance extraordinaire, comme le tween 80 ou la N-acétyl-D-glucosamine, n'est indispensable dans la composition initiale du milieu de culture.

Certains milieux naturels se trouvent dans des régions particulièrement stables. Ils ont été sélectionnés par la pratique ; le milieu Riz-Agar-Tween est parmi ceux-là. Leur remplacement par un milieu synthétique ne s'impose pas sauf dans certains cas particuliers : études physiologiques ou biochimiques par exemple.

L'influence des conditions initiales sur le déroulement du processus morphogénétique est intéressante à considérer. Nous avons déjà montré que les chlamydospores apparaissent plus ou moins tôt, selon la densité d'ensemencement ou les conditions d'aérobiose. Nous dirons ultérieurement le parti que l'on peut tirer de ces observations.

On pourra cependant reprocher à cette étude physiologique de la chlamydosporulation d'être très incomplète ; on dira probablement que nous sommes resté "autour des phénomènes respiratoires" alors qu'il était possible de les disséquer. Nous aurions dû comparer les levures "Sabouraud", les levures "ER-G éclairées", le pseudomycélium et les chlamydospores en les broyant et en isolant différentes molécules que nous aurions dû doser. Nous aurions dû aussi isoler les mitochondries des différentes formes et les étudier. Nous aurions dû également faire agir de plus nombreux inhibiteurs et essayer de nous y retrouver dans le dédale des voies métaboliques. Nous ne l'avons pas fait. C'est peut-être à cause de notre incompetence ; mais la compétence nécessaire peut s'acquérir ; il faut alors incriminer notre paresse : à quoi bon tout casser, étaler les morceaux dans de nombreuses publications si cela ne permet jamais d'avoir une hypothèse globale, un modèle du fonctionnement de l'objet de nos études ? Il ne suffit pas non plus que le modèle soit

une suite d'équations qui "collent" plus ou moins bien aux résultats expérimentaux. Ce que nous recherchons, c'est un schéma général qui puisse expliquer les divers comportements de notre système. Nous croyons que la théorie des catastrophes peut répondre à notre attente. La voie que nous avons choisie est sans doute difficile ; notre paresse n'est pas le refus de tout effort mais le refus d'un effort qui ne nous a pas paru très utile.



### III. THEORIE DES CATASTROPHES ET MORPHOGENESE DE CANDIDA ALBICANS

Nous l'avons annoncé précédemment : après ce catalogue de faits relatifs à la chlamydo sporulation de *Candida albicans*, nous allons tenter d'en donner une interprétation ; cela nous conduira à des idées nouvelles qu'il s'agira de vérifier expérimentalement ; des voies seront ouvertes...

Notre interprétation sera faite dans le cadre de la théorie des catastrophes ; il nous faut d'abord exposer certains aspects de cette théorie. La bande dessinée de STEWART (105) peut faciliter la compréhension des prochains paragraphes.

#### III.1 LA THÉORIE DES CATASTROPHES

##### 3.1.1. PRESENTATION.

La théorie des catastrophes (T.C.) est le résultat des travaux du mathématicien THOM sur la stabilité structurelle des fonctions : "étant donné "une forme" géométriquement définie par le graphe d'une fonction  $F(x)$  par exemple, on se propose de savoir si cette fonction est "structurellement stable", c'est à dire si en perturbant la fonction  $F$  suffisamment peu, la fonction


perturbée  $G = F + \delta F$  a encore la même forme (topologique) que la fonction  $F$  initiale" (THOM, 112). A la même époque où il étudie la stabilité structurelle des fonctions, THOM lit des traités d'embryologie. La T.C. est née de la rencontre de ces deux types d'études. C'est une théorie de la forme, des processus de création et de destruction de la forme ; la nature du substrat de la forme peut être matérielle ou non (112).

Un autre mathématicien, ZEEMAN, a élargi le champ d'application de la T.C. en la plaçant dans le cadre d'une "théorie des systèmes" avec une orientation vers la pratique, les résultats concrets : la T.C. permet de décrire des phénomènes dans lesquels des variations continues des paramètres produisent une variation brutale d'une variable. De tels phénomènes existent en physique (transitions de phase), en physiologie (notion de seuil) et dans de nombreux autres domaines. La T.C. permet donc de modéliser un phénomène local : une discontinuité. Elle permet une théorisation de ces phénomènes : elle s'appliquera à des lois quantitatives précises (en mécanique par exemple) et dans ce cas elle donne une interprétation qualitative rapide du comportement global des solutions et des discontinuités (voir plus loin l'exemple de la machine de ZEEMAN).

Dans d'autres domaines (en biologie par exemple), on part d'une morphologie empirique (disposition des seuils dans un espace multidimensionnel) qu'il s'agit d'interpréter. Moyennant certaines hypothèses sur le système on s'efforce de faire coïncider la morphologie observée avec un ensemble de catastrophes du modèle. Généralement les modèles obtenus sont qualitatifs, et permettent une classification analogique de la situation dynamique qui est supposée engendrer la morphologie observée. On a parlé à ce propos de "métaphore mathématique". Pour certains, cette expression apparaît comme une critique sévère de la T.C. ; pour d'autres au contraire elle montre le rapprochement de phénomènes entièrement différents, fait ressortir les mécanismes communs d'un grand nombre de phénomènes.

Tout cela est bien abstrait ; nous comprendrons mieux sur un exemple :

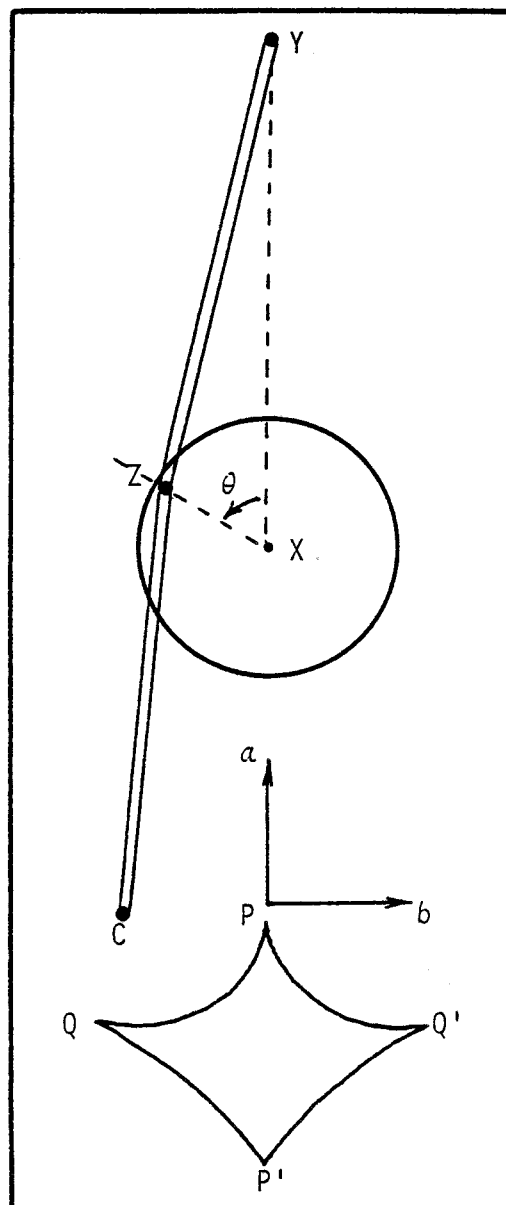
### 3.1.2. UN EXEMPLE : LA MACHINE DE ZEEMAN.

ZEEMAN, qui a beaucoup fait pour divulguer les idées de THOM, a inventé et décrit (131) une machine à catastrophes. C'est un petit jouet que l'on peut construire soi-même : il faut pour cela deux élastiques identiques, 3 punaises, une planchette de bois et du carton épais. L'unité de longueur est la longueur des élastiques non tendus. On découpe dans le carton un disque de diamètre égal à 1 unité. La planchette doit mesurer 2 x 6 unités. Une punaise X est piquée au centre du disque (axe de rotation) puis au centre de la planchette (voir figure 34). Les deux élastiques sont noués ensemble  et le noeud est enfilé sur la punaise Z elle-même piquée, pointe vers le haut, dans le disque de carton près de la circonférence. L'un des élastique est tendu et maintenu à son extrémité à l'aide de la punaise Y (distance XY = 2 unités). La machine est prête à fonctionner : prenons l'extrémité (C) de l'autre élastique sur la pointe d'un crayon par exemple et déplaçons-la sur la planchette.

Si nous reprenons la terminologie employée précédemment, la machine de ZEEMAN est le système que nous allons étudier, la "boîte noire" à laquelle nous faisons allusion au paragraphe 1.3. Les entrées sont les différentes positions de C repérées dans un système d'axes de coordonnées (b,a) tracés sur la planchette ; les sorties sont les différentes positions de Z (repérées par l'angle  $\theta = \widehat{Y X Z}$ ). La "seule manière de dévoiler une boîte noire est de jouer avec" (112). Déplaçons donc C.

Après un moment de jeu, on constate deux types de variations pour l'angle  $\theta$  : des variations continues et des variations brutales. Notons sur la planchette l'ensemble des points où se produisent des variations soudaines (toujours en jouant, c'est à dire en faisant des expériences). On obtient ainsi un tracé, noté PQ P'Q' sur la figure 34, qui ressemble un peu à un as de carreau de nos jeux de cartes. Lorsque l'extrémité de l'élastique se déplace parallèlement à QQ' et passe de l'intérieur vers l'extérieur de l'as de carreau ( $\diamond$ ), on observe une variation brutale de l'angle  $\theta$ . Les points du périmètre PQ P'Q' ont été appelés par THOM "Points de catastrophe" (c'est ZEEMAN qui a introduit le vocable "Théorie des catastrophes"). Le mot "catastrophe" peut sembler mal choisi, mais il est maintenant consacré par l'usage et décrit finalement assez bien la situation même s'il fait penser à autre chose.

Figure 34 : La machine de ZEEMAN.





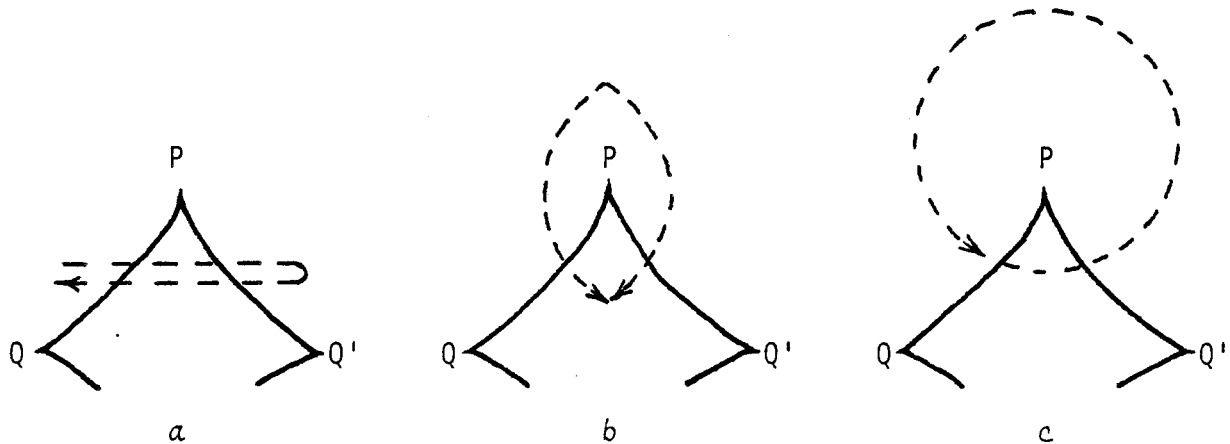
Jouons encore un peu ; sur la figure 35 nous indiquons plusieurs déplacements à essayer : en (a) l'extrémité C de l'élastique part d'un point situé à gauche de  $\diamond$  traverse  $\diamond$  puis revient par le chemin inverse. On observe un phénomène d'hystérésis : la catastrophe ne se produit pas au même endroit à l'aller et au retour : la machine de ZEEMAN a une mémoire. Lorsque C se trouve à l'intérieur de  $\diamond$  , à une position de C correspondent deux valeurs de  $\theta$  ; le choix entre ces deux valeurs dépend de l'état antérieur du système, de son histoire.

En (b) de la figure 35, C part d'un point situé à l'extérieur de  $\diamond$  non loin de P et gagne un point situé à l'intérieur. Deux chemins possibles sont indiqués. Jouons et observons les variations de  $\theta$ , nous remarquons que :

- 1) les variations sont continues, il n'y a pas de catastrophe ;
- 2) les deux chemins très voisins l'un de l'autre, partant d'un même point et aboutissant à un même point, produisent des effets opposés (deux valeurs de  $\theta$  opposées) : c'est le phénomène de divergence.

En (c) de la figure 35, nous proposons de faire décrire à l'extrémité C de l'élastique plusieurs fois un cercle centré sur le point P et recoupant PQ'. Les variations de  $\theta$  sont très intéressantes à observer : à chaque tour décrit par C,  $\theta$  varie brutalement lorsque C sort de  $\diamond$  , mais  $\theta$  revient progressivement à sa valeur initiale avant de varier de nouveau brutalement mais toujours dans le même sens. On peut voir dans ce comportement une certaine ressemblance avec les variables du cycle de division cellulaire : par exemple, le volume cellulaire diminue brutalement au moment de la division cytoplasmique et retrouve progressivement sa valeur initiale. On peut pousser l'analogie plus loin : sur la figure 35 (c) on peut faire varier le rayon du cercle décrit par C, on constatera que la valeur atteinte par  $\theta$  avant sa variation brusque est d'autant plus grande que le rayon du cercle décrit par C est lui-même plus grand (tant que le cercle recoupe PQ'). Dans le cycle de division cellulaire, on évoque également un volume critique "variable" en relation avec le taux spécifique de croissance (13, 51, 60, 115, 129). Cette analogie mériterait d'être approfondie.

Figure 35 : Quelques déplacements proposés pour l'extrémité C de l'élastique de la machine de ZEEMAN.



Voyons maintenant la notion d'équilibre. Plaçons C à l'intérieur de  $\diamond$  et perturbons légèrement la variable  $\theta$ , c'est à dire faisons tourner très légèrement le disque ; lorsque nous le relâchons, le disque revient à sa position initiale qui est donc une position d'équilibre stable. Au voisinage des bords de  $\diamond$ , l'équilibre est moins stable. On peut également trouver des positions d'équilibre instable : plaçons C à l'intérieur de  $\diamond$  sur la ligne XY, plaçons Z également sur cette ligne. Notre machine admet alors un axe de symétrie (XY). Cette position est une position d'équilibre, mais c'est une position très instable, si l'on déplace Z même très légèrement, c'est-à-dire si l'on fait varier très légèrement  $\theta$ , l'équilibre est rompu et le disque se place dans une autre position d'équilibre, stable cette fois. La figure perd sa symétrie (phénomène de brisure de symétrie).

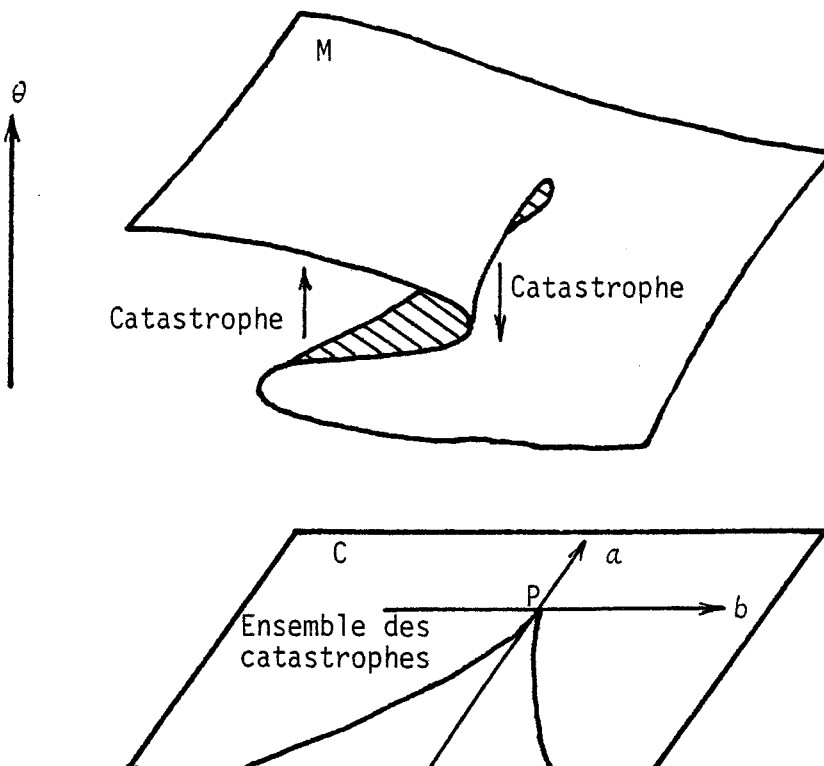
Essayons maintenant d'indiquer dans un espace à 3 dimensions les positions d'équilibre de  $\theta$  en fonction des coordonnées (b,a) de C. Nous obtenons la figure 36 (pour ne pas compliquer la figure, nous avons limité les déplacements de C dans la partie PQQ' de  $\diamond$ ). Les positions d'équilibre de  $\theta$  sont sur la surface M, la partie hachurée correspond aux positions d'équilibres instables. Si nous essayons d'éloigner  $\theta$  de cette surface (ce que nous avons fait plus haut à propos de la notion d'équilibre)  $\theta$  revient sur cette surface et on peut distinguer deux types de régions : la région non hachurée sur la figure qui agit comme un attracteur (d'où les équilibres stables) et la région hachurée qui agit au contraire comme répulseur (d'où

les équilibres instables). Si au cours d'une perturbation de  $\theta$  on franchit cette région hachurée, l'équilibre de  $\theta$  change (d'où les équilibres moins stables quand  $C$  est au voisinage de  $\diamond$ ). Lorsque nous faisons varier les coordonnées  $(b,a)$  du point  $C$ ,  $\theta$  reste sur la surface  $M$ , mais nous voyons que pour certaines valeurs de  $(b,a)$   $\theta$  change brutalement de nappe, c'est ce que nous avons appelé une catastrophe.

Si nous voulons connaître la valeur de ces coordonnées, il suffit de projeter sur le plan  $C$  l'ensemble des points de  $M$  pour lesquels le plan tangent à  $M$  est "vertical". La ligne obtenue est appelée "ensemble des catastrophes" ("bifurcation set" en anglais).

Essayons de nous résumer : nous étions en face d'un système, la machine de ZEEMAN. Nous avons identifié des entrées, les positions du point  $C$  sur un plan ; nous appellerons par la suite les coordonnées  $(b,a)$  du point  $C$  les paramètres. Le système répond aux entrées par des sorties : ce sont les valeurs de  $\theta$  que nous appellerons par la suite la variable. Pour "dévoiler" le système, nous avons joué avec lui (fait des expériences) ; nous avons dressé un catalogue indiquant les sorties obtenues en fonction des entrées essayées. Un résumé du catalogue pourrait être la figure 36.

Figure 36 : La surface d'équilibre et sa projection sur l'espace des paramètres.



Il nous reste à interpréter le système, à trouver une loi qui décrit son fonctionnement :

Cette interprétation fait intervenir un potentiel  $V$  qui est une fonction de  $\theta$  et qui dépend des paramètres  $a$  et  $b$ . Les valeurs d'équilibre de  $\theta$  correspondent aux minima et aux maxima du potentiel. Les minima sont des attracteurs (d'où des équilibres stables), tandis que les maxima sont des répulseurs (d'où des équilibres instables).

Disons pour être plus concret que ce potentiel correspond, pour la machine de ZEEMAN, à l'énergie potentielle des élastiques tendus ; le système se place sur une position d'équilibre qui minimise cette énergie. Dans des systèmes plus complexes que la machine de ZEEMAN, il ne sera pas toujours possible d'identifier le potentiel.

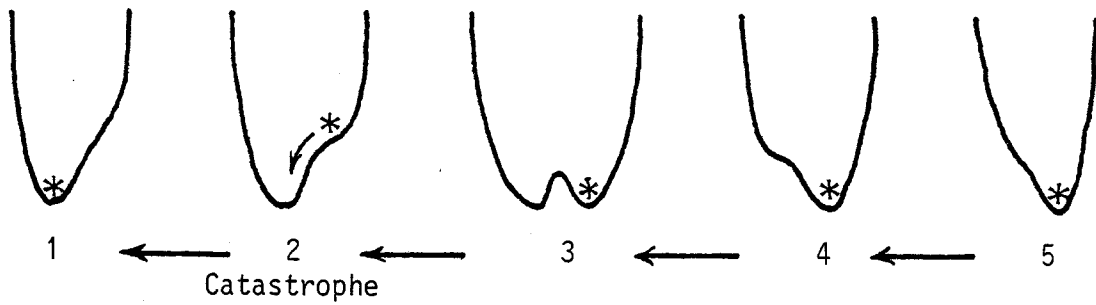
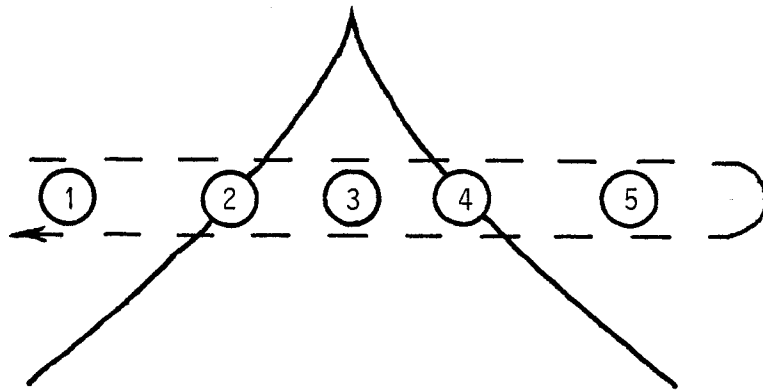
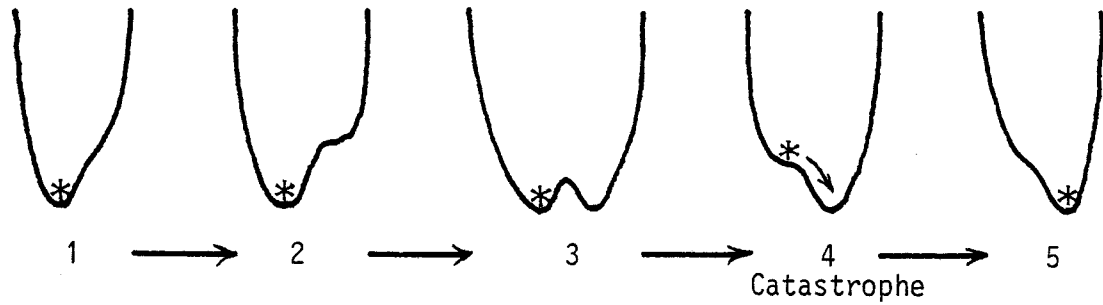
La figure 37 montre la forme de la fonction  $V = f(\theta)$  pour les valeurs des coordonnées de l'extrémité C de l'élastique dans le cas étudié à la figure 35(a). La forme de la courbe est la même à l'aller et au retour, mais les catastrophes ne se produisent pas au même endroit. Pour mieux se représenter ce qui se passe on peut imaginer une bille qui se déplace sur un relief. Elle s'arrête au fond d'une vallée (minimum d'énergie potentielle) et y reste tant qu'il n'y a qu'une seule vallée, ou que la vallée où elle se trouve est séparée d'une autre par une crête.

La machine de ZEEMAN répond à la convention du délai parfait : la variable  $\theta$  se place sur un minimum local du potentiel et ne le quitte que lorsque ce minimum dégénère, d'où le phénomène d'hystérésis que nous avons mentionné.

D'autres systèmes répondent à la convention de MAXWELL. Dans ce cas la variable se place sur le minimum absolu du potentiel et il n'y a pas de phénomène d'hystérésis.

La machine de ZEEMAN est un exemple pris dans le domaine de la mécanique. L'énergie potentielle des élastiques tendus répond à une loi physique et on peut déterminer par le calcul l'ensemble des catastrophes (voir par exemple POSTON et STEWART (81) p. 75 et suivantes). La théorie des catastrophes donne une interprétation qualitative rapide du comportement de cette machine. En effet, THOM a montré que si le nombre des variables est

Figure 37 : Forme de la fonction de potentiel pour diverses valeurs des paramètres et interprétation du fonctionnement de la machine de ZEEMAN.



inférieur ou égal à 2 et celui des paramètres inférieur ou égal à 4, les situations les plus compliquées que l'on puisse rencontrer localement sont en nombre fini et peuvent être classées : ce sont les 7 catastrophes élémentaires. On pourra trouver la démonstration de ce résultat fondamental dans l'article de ZEEMAN et TROTMAN (136).

### 3.1.3. LES CATASTROPHES ELEMENTAIRES.

Nous donnerons ici la liste des 7 catastrophes élémentaires avec leur description sommaire ; une description plus détaillée peut se trouver dans le livre de POSTON et STEWART par exemple (81). Tout ce qui est dit ici est valable localement.

#### a) catastrophes à une variable :

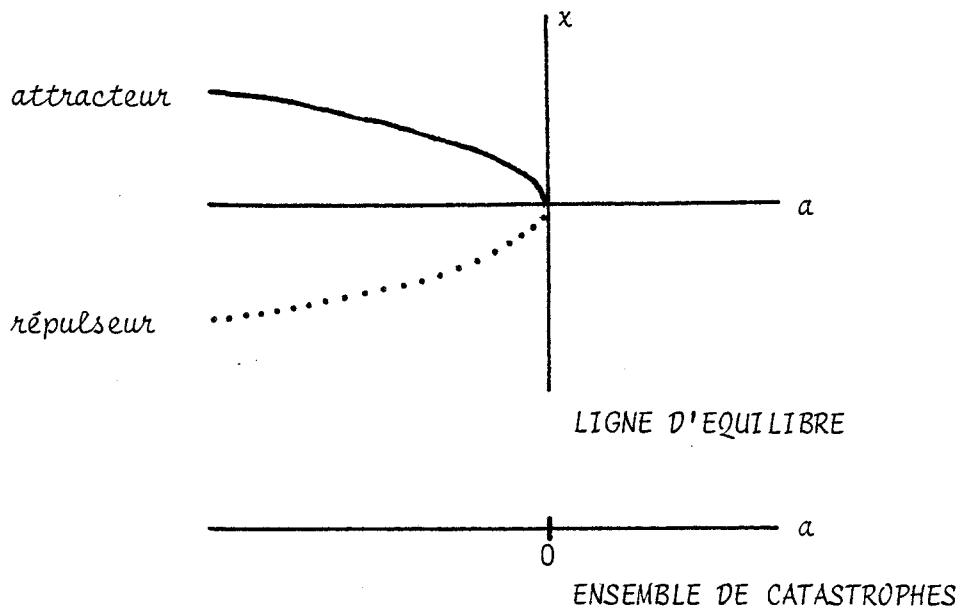
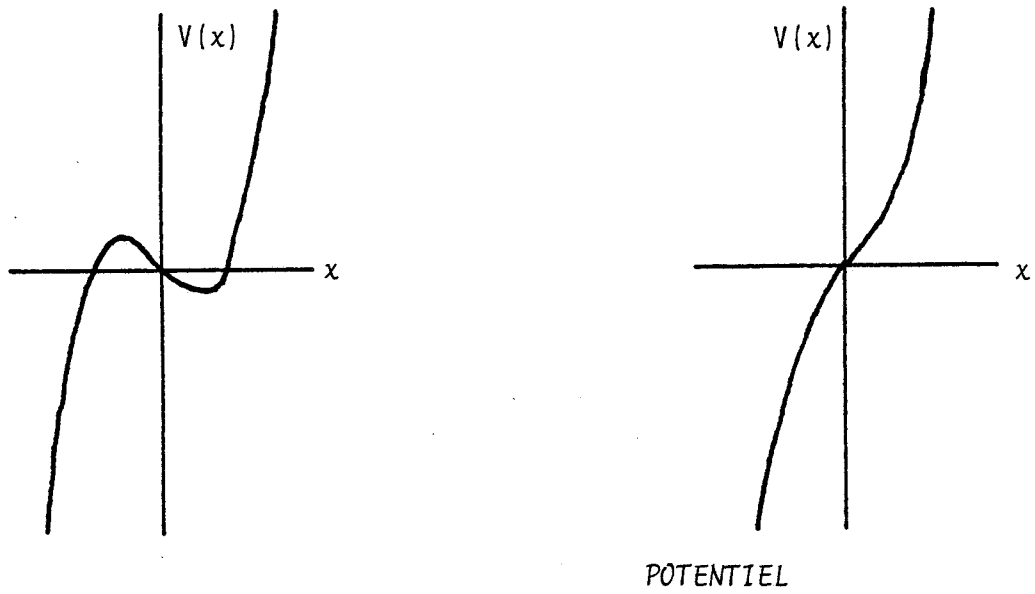
.le pli : c'est la catastrophe la plus simple ; on la rencontre lorsque l'espace de contrôle est à une dimension (un seul paramètre). Le pli est associé à un potentiel de la forme

$$V_a(x) = \frac{1}{3} x^3 + ax$$

La figure 38 montre que l'ensemble des catastrophes est constitué uniquement par le point  $a = 0$  (avec la règle du délai parfait ; avec la règle de MAXWELL,  $x$  tend toujours vers  $-\infty$  il n'y a pas de catastrophe). La figure 38 indique également les valeurs de  $x$  en fonction de la valeur du paramètre  $a$ , ainsi que la forme du potentiel pour  $a > 0$  ou  $a < 0$ . La variable  $x$  se place sur l'attracteur qui correspond à un minimum de potentiel.

.la fronce : elle se rencontre lorsque l'espace de contrôle est à deux dimensions (deux paramètres). Elle est associée à un potentiel de la forme  $V_{ab}(x) = 1/4 x^4 + 1/2 ax^2 + bx$ . La figure 39 représente, en appliquant la règle du délai parfait, l'ensemble de catastrophes, les valeurs de  $x$  en fonction des paramètres  $a$  et  $b$  ainsi que la forme du potentiel pour différentes valeurs de  $a$  et  $b$ . Nous retrouvons les éléments de la description de la machine de ZEEMAN. Remarquons que l'ensemble de catastrophes est constitué de deux lignes de points pli ayant un point commun, le point fronce.

Figure 38 : Le pli.



potentiel  $V_a(x) = \frac{1}{3} x^3 + ax$

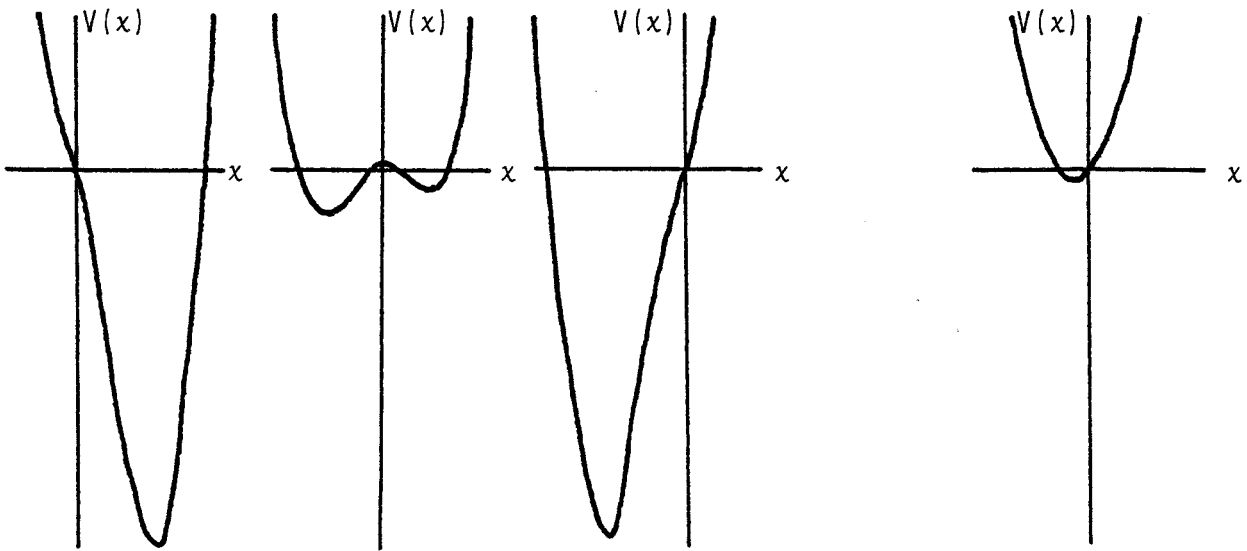
$x$  = variable

$a$  = paramètre

(l'ensemble de catastrophes comprend uniquement le point 0).



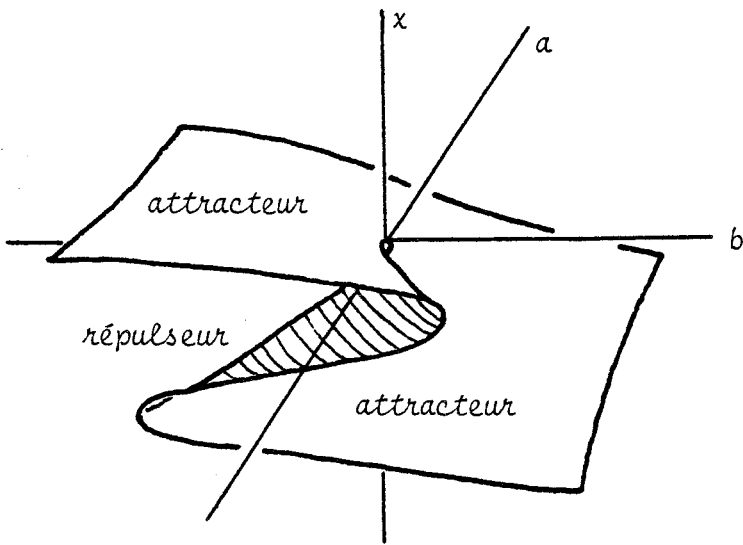
Figure 39 : La frounce.



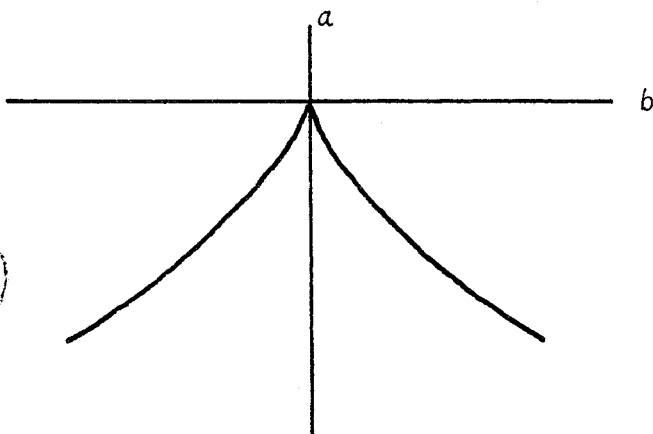
POTENTIEL

potentiel  $V_{ab}(x) = 1/4 x^4 + 1/2 ax^2 + bx$

$x$  = variable  
 $a, b$  = paramètres



SURFACE D'EQUILIBRE



ENSEMBLE DE CATASTROPHES



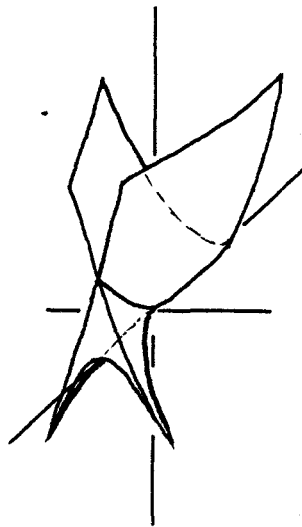


Nous faisons remarquer que ce point pourrait apparaître dans un espace à une dimension, si nous lions les paramètres  $a$  et  $b$  par la relation  $a = mb$  ; le théorème fondamental de la théorie des catastrophes prévoit que l'ensemble des catastrophes dans un espace de contrôle à une dimension n'est constitué généralement que de points plis. Ce théorème n'est pas ici en défaut car une petite perturbation de la relation  $a = mb$ ,  $a = mb - \epsilon$  nous ramène au cas général et le point fonce se dédouble en deux points plis.

Remarquons également que le potentiel est exprimé ici sous une forme canonique, d'où la présence, par exemple, des coefficients  $1/4$  et  $1/2$  qui facilitent les calculs (ils disparaissent dans le calcul de la dérivée du potentiel). Mais on peut effectuer n'importe quel changement d'axes de coordonnées dans le plan des paramètres  $a$  et  $b$ .

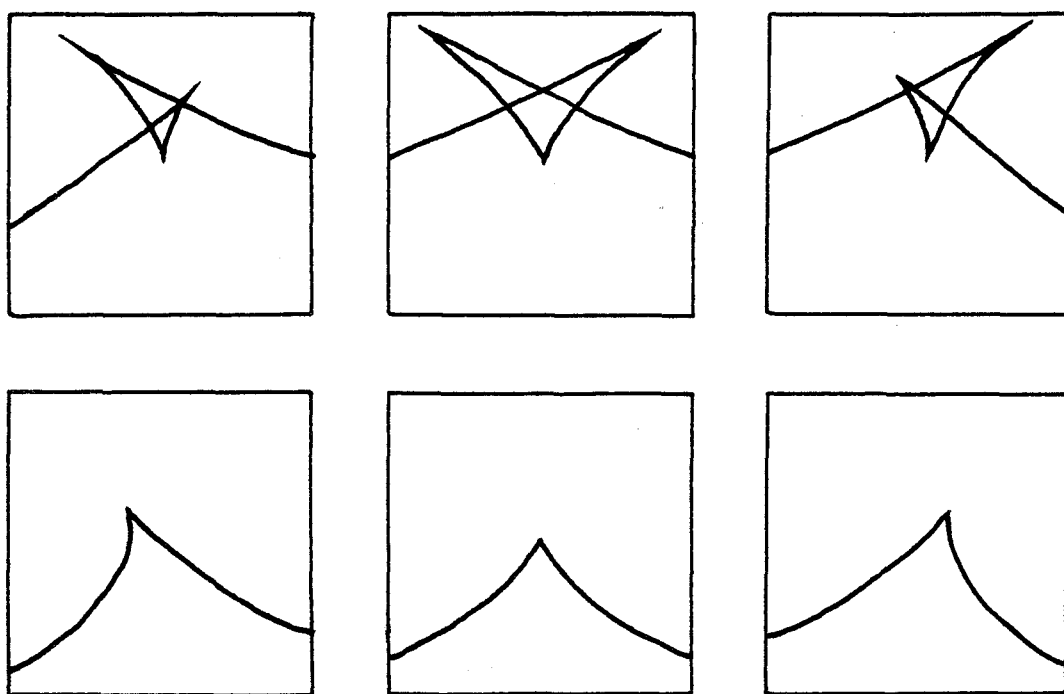
la queue d'aronde : dans un espace de contrôle à 3 dimensions, on peut rencontrer des points plis, des points fonces, et un nouveau type de point catastrophe, le point queue d'aronde. Le potentiel associé à la queue d'aronde est de la forme  $V_{abc}(x) = 1/5 x^5 + 1/3 a x^3 + 1/2 b x^2 + cx$ . Nous ne pourrions plus cette fois figurer sur une feuille les valeurs de la variable en fonction de celles des paramètres car il nous faudrait dessiner un espace à 4 dimensions. La figure 40 se contente donc de représenter l'ensemble des catastrophes.

Figure 40 : La queue d'aronde : ensemble de catastrophes.



.le papillon : il se rencontre dans un espace de contrôle à 4 dimensions, il est associé à un potentiel de la forme  $V_{abcd}(x) = 1/6 x^6 + 1/4 ax^4 + 1/3 bx^3 + 1/2 cx^2 + dx$ . Nous ne pourrions même plus dessiner l'ensemble des catastrophes sur une feuille. On le représente à l'aide de sections planes successives (figure 41).

Figure 41 : Le papillon : quelques sections planes de l'ensemble de catastrophes.



b) catastrophes à deux variables : ce sont les ombilics. Dans un espace de contrôle à 3 dimensions on rencontre 2 types d'ombilics :

.l'ombilic elliptique (potentiel  $V_{abc}(x,y) = x^3 - 3xy^2 + a(x^2 + y^2) + bx + cy$ ) a un ensemble de catastrophes qui évoque un poil ;

.l'ombilic hyperbolique (potentiel  $V_{abc}(x,y) = x^3 + y^3 + axy + bx + cy$ ) évoque une vague qui déferle.

L'ombilic parabolique se rencontre dans un espace de contrôle à 4 dimensions, il est associé au potentiel  $V_{abcd}(x,y) = x^2y + y^4 + ax^2 + by^2 + cx + dy$ .

## III.2 INTERPRÉTATION DE LA CHLAMYDOSPORULATION DE C. ALBICANS EN CULTURE "BATCH"

Dans ce paragraphe nous proposerons une interprétation des résultats exposés jusqu'ici, c'est à dire obtenus en culture "batch". Ce terme peut se traduire en français par "en fournée" et il s'oppose à culture continue.

Avant toute chose, il nous faut donner une définition précise et rigoureuse des concepts employés. Ce n'est que dans ces conditions que nous pourrons employer une théorie mathématique.

### 3.2.1. CHOIX ET DEFINITIONS.

Nous avons dit que nous étudions un système.

Un système est une entité qui à toute entrée répond par une sortie. Les entrées seront définies par les valeurs des paramètres, les sorties par les valeurs des variables (selon la terminologie indiquée précédemment).

Il nous faut maintenant limiter et définir le système, la variable et les paramètres.

a) le(s) système(s) : nous ensemençons des levures dans un milieu de culture (contenu dans une fiole). Nous pouvons envisager deux types de systèmes différents :

-ou bien le système est le microorganisme lui-même, et dans ce cas il faut considérer tous les thalles comme autant de systèmes car un système est un domaine de l'espace-temps ; un domaine de l'espace euclidien est un ouvert connexe. Pour aller d'un point à un autre du système, on ne doit pas en sortir ;

-ou bien le système est le contenu de la fiole, c'est à dire le milieu de culture avec les thalles qu'il contient.

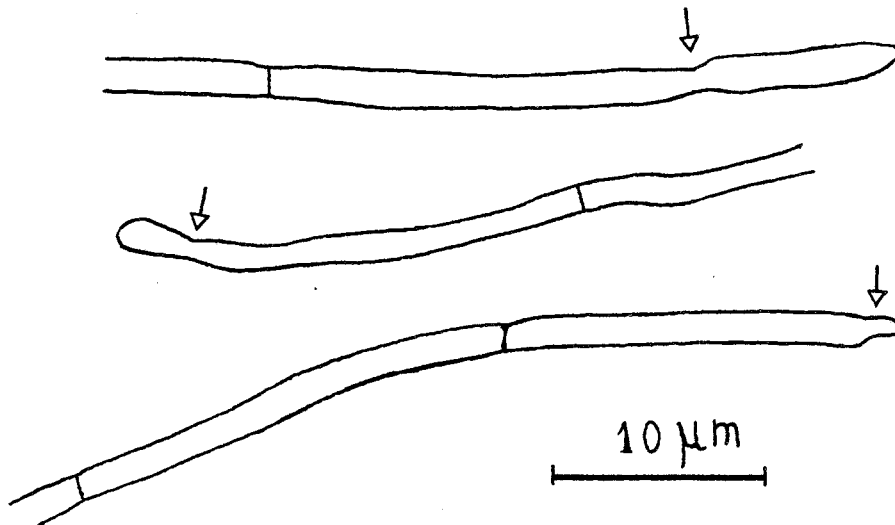
b) la variable : nous avons choisi comme variable l'aspect morphologique ; cette variable peut se placer sur 4 valeurs différentes : levure, pseudomycélium, mycélium, chlamydospore. On peut se poser la question : est-ce une variable continue ? Existe-t-il des formes de transition entre les valeurs trouvées habituellement ? Nous pensons qu'on peut répondre par l'affirmative au moins

en ce qui concerne les aspects levure et pseudomycélium. Nous avons observé du pseudomycélium à articles plus ou moins allongés et des cellules d'aspect levuriforme qui ne se séparent pas et forment des chaînes.

On peut aussi imaginer des formes de transition entre le pseudomycélium et le mycélium. En effet, le pseudomycélium est caractérisé par une croissance discontinue (bourgeonnement) et le mycélium par une croissance continue. On peut très bien imaginer un bourgeonnement sur une base de plus en plus large avec un simple ralentissement de croissance au lieu d'un arrêt complet. On peut aussi imaginer un mycélium dont la croissance se ralentit périodiquement.

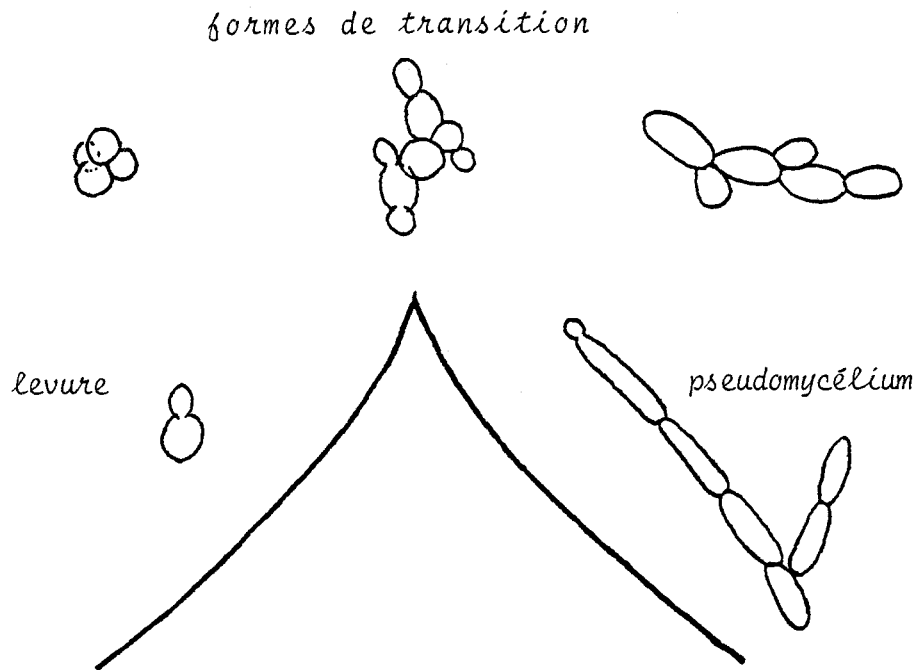
Nous avons effectivement observé quelquefois une légère variation subapicale du diamètre du mycélium (figure 42).

Figure 42 : Mycélium de *Candida albicans* avec une légère constriction subapicale.



Ces formes de transition ne nous étonnent pas : imaginons que deux paramètres contrôlent la transformation levure  $\longleftrightarrow$  pseudomycélium ; nous pouvons utiliser le modèle de la fronce et comprendre cette variation continue (figure 43).

Figure 43 : Interprétation à l'aide d'une fronce des formes de transition que l'on observe entre la levure et le pseudomycélium de *Candida albicans*.



Lors d'une transformation morphologique, ce n'est pas l'ensemble des cellules du thalle qui change d'aspect, ce sont les productions de ces cellules. Si dans un premier temps on peut se contenter d'utiliser comme variable le changement d'aspect des thalles, il sera intéressant plus tard de se placer dans le contexte du cycle de division cellulaire et de choisir comme système une cellule, et reposer le problème du choix de la variable.

c) les paramètres : la nature des paramètres dépend du système que l'on décide d'étudier : si on choisit le microorganisme (en fait un thalle), les paramètres sont les concentrations des constituants du milieu à chaque instant (glucose, ions, vitamines, mais aussi gaz dissous, produits de métabolisme), la température, l'éclairement...

Les concentrations des constituants du milieu varient constamment et sont difficiles à connaître à chaque instant. De plus, pour que la théorie des catastrophes puisse s'appliquer, il faut que cette dynamique externe au

système soit lente par rapport à la dynamique interne pour qu'à chaque instant le système puisse être en équilibre. Nous ne pouvons pas contrôler cette dynamique des paramètres et il n'est pas certain que le système soit toujours sur une position d'équilibre stable.

Si le système choisi est le contenu de la fiole, les paramètres ne sont plus que la température, l'éclairement... Mais dans ce cas, il faut remarquer que nous fabriquons le système au temps  $t = 0$  lorsque nous ensemencions les fioles. Le système que nous fabriquons est loin de son état d'équilibre. Cette fois, nous pouvons maintenir les paramètres constants. Mais nous avons perturbé les variables et nous observons un retour de ces variables sur une position d'équilibre. Nous disons cette fois les variables (et non la variable) car les concentrations des constituants du milieu sont devenues des variables. Le phénomène est sensible aux conditions initiales : des équilibres différents seront observés selon les valeurs choisies pour les variables au début de la culture.

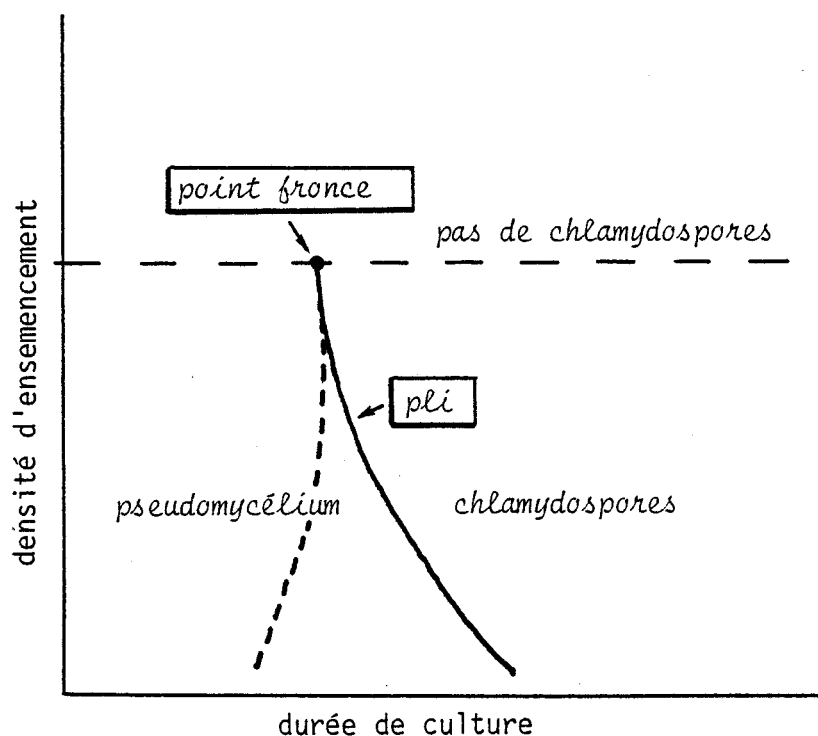
### 3.2.2. LE SYSTEME EST "LE MICROORGANISME".

3.2.2.1) interprétation de faits exposés précédemment : nous venons de le dire, si l'on envisage ce type de système, les paramètres sont des fonctions du temps (durée de culture). Sous certaines conditions, on peut choisir le temps comme l'un des paramètres. On peut essayer d'étudier la variable (la morphologie) dans l'espace de contrôle à une dimension : le temps. C'est ce que nous avons fait lorsque nous avons étudié le déroulement de la morphogénèse (chapitre 2 et (27)). Dans certaines conditions de culture, la morphologie des thalles est pseudomycélienne, puis, après un temps que l'on peut préciser, les chlamydo-spores apparaissent brutalement. On peut parler d'une durée de culture critique et modéliser le phénomène par un pli. En fait nous avons montré, dans la même étude, que le changement brutal, la catastrophe, se produit un peu plus tôt à l'échelon cellulaire. Cet instant peut être repéré de manière précise par le transfert des thalles dans l'eau.

Nous avons également montré que la durée de culture critique est d'autant plus longue que la densité d'ensemencement est plus faible. Cette fois la situation est plus compliquée : l'espace de contrôle est à deux dimensions : la durée de culture et la densité d'ensemencement.

La densité d'ensemencement est un paramètre ; en effet notre système est "1 thalle" et par conséquent le nombre de thalles qui l'entourent est un paramètre. La théorie des catastrophes nous enseigne que, localement, la situation la plus compliquée que nous pouvons rencontrer (si la théorie s'applique, c'est à dire moyennant des hypothèses sur le système, en particulier si la dynamique est une dynamique de gradient) est la fronce. Les observations peuvent s'interpréter effectivement de cette manière (figure 44).

Figure 44 : Interprétation du déroulement de la morphogénèse en fonction de la densité d'ensemencement.



--- : pli qui correspondrait à la transformation chlamydo-spore → pseudomycélium si la durée de culture était réversible.

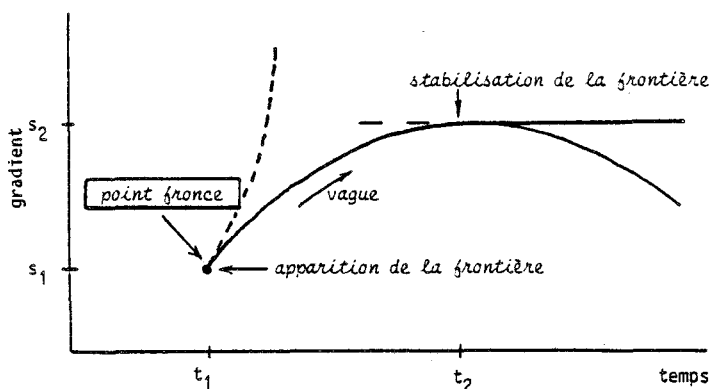
Il existe une limite maximum à la densité d'ensemencement qui correspond à la localisation d'un point fronce. En fait, on devrait observer, au-delà de cette densité maximum d'ensemencement, des formes intermédiaires entre le pseudomycélium et les chlamydo-spores et une transformation progressive, continue en chlamydo-spores. Plus bas dans le gradient, lorsqu'il y a production de chlamydo-spores, celles-ci apparaissent d'autant plus tardivement que la densité d'ensemencement est plus faible (27).

Le deuxième paramètre de contrôle (la densité d'ensemencement dans l'exemple précédent) peut être étudié d'une manière "géographique" si on réalise une variation continue de la densité d'ensemencement en fonction d'une distance, c'est à dire si on réalise sur un milieu de culture (gélifié) un gradient de densité d'ensemencement.

Voyons, théoriquement, ce que nous devons observer. Il suffit de remplacer l'axe des ordonnées de la figure 44 par un axe représentant des distances (dans un gradient). Nous voyons alors que les chlamydo-spores vont apparaître en un certain endroit, une frontière va se former qui délimitera une zone avec chlamydo-spores. Cette frontière se déplacera ensuite vers les faibles densités d'ensemencement du gradient. On observera une vague de chlamydo-spores. C'est ZEEMAN (132) qui, le premier, a proposé le modèle de la fronce pour décrire des frontières qui se déplacent dans des gradients. Il a lui-même appliqué ce modèle au développement embryonnaire des amphibiens et à la morphogénèse du myxomycète *Dictyostelium discoideum*. Le modèle a aussi été appliqué en écologie ; plusieurs exemples sont cités par POSTON et STEWART (81).

Généralement, l'axe de la fronce est incliné sur l'axe des temps ; en conséquence, la frontière se stabilise car il existe alors une droite parallèle à l'axe des temps, tangente à la fronce. La figure 45 montre la théorie du phénomène : au temps  $t_1$  une frontière apparaît à l'endroit  $s_1$  du gradient, cette frontière se déplace (vague) puis se stabilise au temps  $t_2$  à l'endroit  $s_2$ . Ce modèle a été proposé pour décrire des formations et déplacements de frontières dans des gradients existant naturellement (latitude, altitude, gradient animal-végétatif d'un embryon, etc...).

Figure 45 : Modèle proposé par ZEEMAN pour décrire l'apparition, le déplacement et la stabilisation d'une frontière dans un gradient.



--- : pli qui correspondrait à la transformation chlamydo-spore  $\rightarrow$  pseudo-mycélium si la durée de culture était réversible.



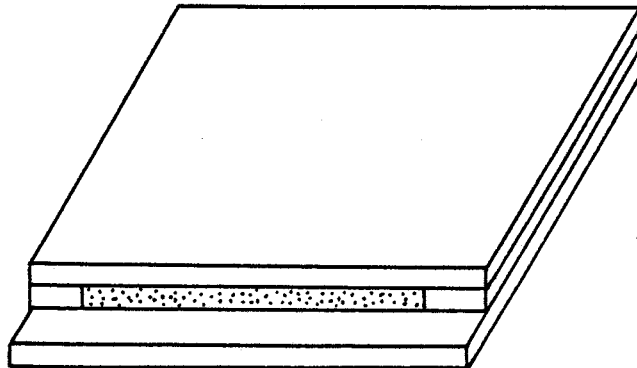
Dans le cas des chlamydospores, lorsqu'on dépose une lamelle sur l'inoculum pour les obtenir, on crée, sans en être bien conscient, un gradient. Si on est bien attentif on observe une frontière, c'est ce que nous avons montré au paragraphe 2.4.1 et (22). Nous avons observé également le déplacement de cette frontière.

Pour notre étude de la chlamydosporulation de *Candida albicans*, nous pouvons créer volontairement des gradients et étudier le déplacement des frontières (24).

3.2.2.2) expérimentation complémentaire : déplacement de frontière dans des gradients :

a. gradient d'"anaérobiose" : nous employons ce terme "gradient d'anaérobiose" pour des raisons de commodité. Ces gradients sont obtenus par injection du milieu Riz-Agar-Tween (ne contenant que 10 g/l d'agar) fondu et ensemencé, dans des cellules de culture formées de 2 lames de verre parallèles écartées de 1 mm (figure 46).

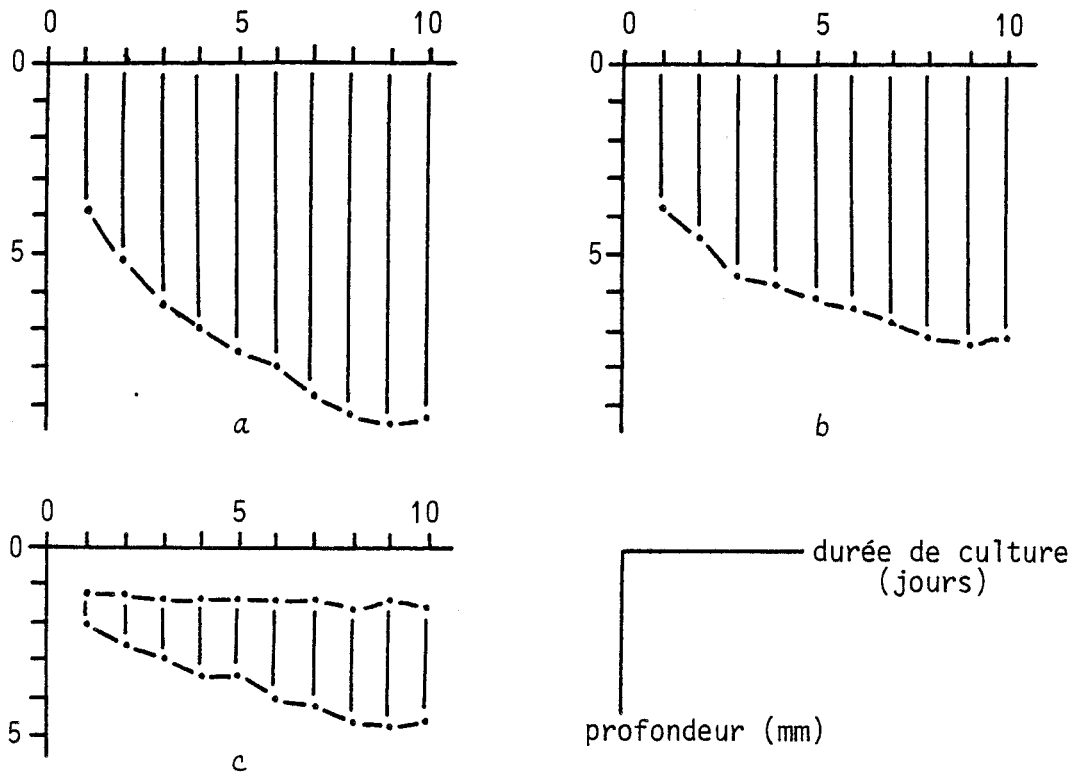
Figure 46 : Cellule de culture utilisée pour réaliser les gradients d'"anaérobiose".




Le milieu est ensemencé à l'aide de levures obtenues par culture de 24 heures à 37°C sur milieu de Sabouraud gélosé du clone 6311.5 de *Candida albicans*.

L'emplacement de la frontière est repéré par rapport à la face de milieu qui se trouve au contact de l'air. Les repérages sont faits, après visée au microscope sur le vernier de la surplatine. Cinq mesures sont effectuées à des endroits différents. Les cellules de culture sont incubées en chambre humide à 28°C.

Figure 47 : Vague de chlamydosporulation de *Candida albicans* dans un gradient d'anaérobiose (profondeur dans une cellule de culture).



Les graphiques indiquent, en fonction de la durée de culture, la zone avec chlamydospores .

Densités d'ensemencement : a :  $10^5$  levures/ml ; b :  $10^6$  levures/ml ;  
c :  $10^7$  levures/ml.

La figure 47 indique l'emplacement des frontières qui séparent les zones avec et sans chlamydo-spores en fonction de la durée de culture. L'expérience a été conduite avec différentes densités d'ensemencement. Pour la plus forte d'entre elles,  $10^7$  levures/ml, on observe une frontière fixe, située à 1,3 mm du bord de la cellule de culture, et une frontière mobile qui se stabilise après 9 jours à 4,7 mm du bord. Comme dans le cas de la densité d'ensemencement, nous pensons que l'emplacement de cette frontière fixe correspond à la localisation du point fronce dans le gradient, mais on devrait observer entre le bord libre de la cellule de culture et l'emplacement de ce point fronce une variation continue de la morphologie et donc des formes intermédiaires entre pseudomycélium et chlamydo-spore. Ces formes devraient évoluer progressivement vers la chlamydo-spore en fonction de la durée de culture. Cette frontière fixe nous semble nette et il est sans doute nécessaire d'envisager un ensemble de catastrophes plus compliqué.

Pour les densités d'ensemencement plus faibles ( $10^6$  et  $10^5$  levures/ml), on n'observe pas la frontière fixe, mais elle pourrait se trouver à l'extérieur de la cellule de culture, à un endroit du gradient que nous ne réalisons pas par notre technique. Néanmoins on observe une frontière mobile qui, comme prévu, se stabilise. Nous remarquons que cette frontière se stabilise d'autant plus loin du bord, que la densité d'ensemencement est plus faible (dans les limites de notre expérience).

Selon la théorie, au voisinage du point de stabilisation de la frontière, on doit observer un ralentissement parabolique : soit  $s$  la position de la frontière dans le gradient à l'instant  $t$ . Cette frontière se stabilise à l'instant  $t_2$  dans la position  $s_2$ . On doit observer une relation de la forme  $(s_2 - s) = k (t_2 - t)^2$ .

Si on pose  $s_2 - s = S$  et  $(t_2 - t)^2 = T$ , le graphe de la fonction  $S = f(T)$  est une droite qui passe par l'origine.

Quelle que soit la densité d'ensemencement, la frontière s'est stabilisée à 9 jours. La relation précédente est valable au voisinage du point de stabilisation. Nous l'avons testée pour les points 6, 7, 8 et 9 jours (l'emplacement de la frontière est une moyenne de 5 mesures).



Densité d'ensemencement  $10^5$  levures/ml :

Durée de culture (jours)	Emplacement de la frontière (mm)	T	S
9	9,48	0	0
8	9,30	1	0,18
7	8,78	4	0,70
6	7,92	9	1,56

$$S = 0,173 T + 0,004$$

$$r^* = 1,00$$

Densité d'ensemencement  $10^6$  levures/ml :

Durée de culture (jours)	Emplacement de la frontière (mm)	T	S
9	7,32	0	0
8	7,22	1	0,10
7	6,84	4	0,48
6	6,38	9	0,94

$$S = 0,105 T + 0,011$$

$$r = 0,99$$

Densité d'ensemencement  $10^7$  levures/ml :

Durée de culture (jours)	Emplacement de la frontière (mm)	T	S
9	4,66	0	0
8	4,58	1	0,08
7	4,10	4	0,56
6	3,90	9	0,76

$$S = 0,087 T + 0,05$$

$$r = 0,95$$



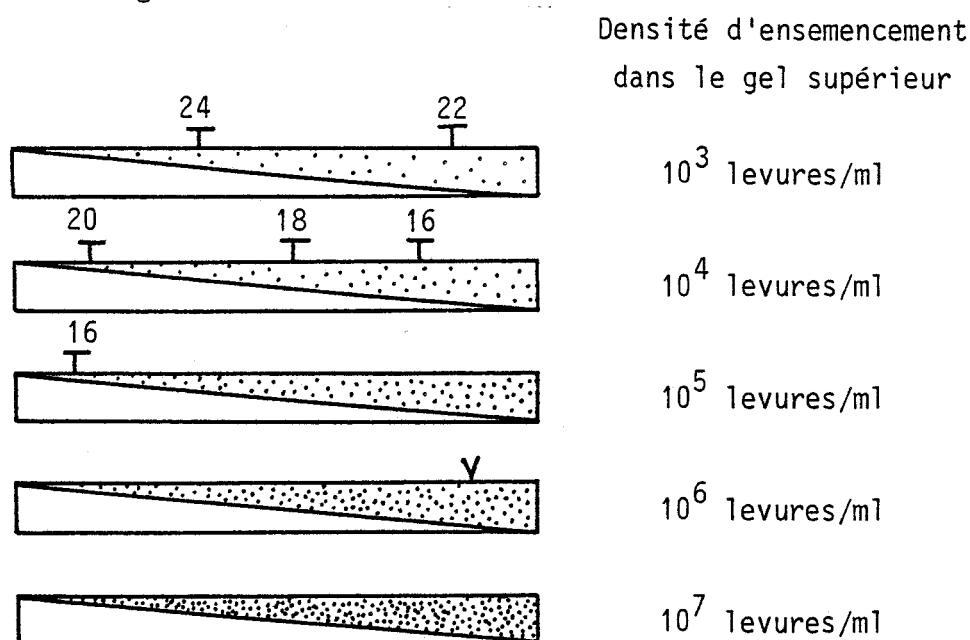
\*r = coefficient de corrélation.

Le ralentissement parabolique de la frontière est donc vérifié de manière satisfaisante. Pour la densité d'ensemencement de  $10^7$  levures/ml les déplacements sont faibles (moins de 1 mm en 3 jours) ; les mesures sont entachées d'une erreur relative plus importante d'où un moins bon coefficient de corrélation de la droite.

b. gradient de densité d'ensemencement : les gradients de densité d'ensemencement sont obtenus dans des boîtes de Pétri, en superposant deux couches de milieu Riz-Agar-Tween en forme de coin ; seule la couche supérieure contient des levures. Différentes concentrations de levures dans le gel supérieur ont été utilisées :  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^7$  levures/ml. Les levures utilisées pour l'ensemencement proviennent d'une culture de 24 heures à  $37^\circ\text{C}$  sur milieu de Sabouraud gélosé, du clone 6311.5 de *Candida albicans*.

Les boîtes contenant les gradients sont incubées à  $28^\circ\text{C}$  et observées périodiquement pour noter la zone avec chlamydospores. Cette fois encore, nous observons une frontière fixe (correspondant à une densité d'ensemencement de  $8,6 \times 10^5$  levures/ml) et une frontière mobile vers les densités d'ensemencement plus faibles (figure 48). Cette frontière se déplace très rapidement ; il ne nous a pas été possible de voir sa stabilisation qui s'observerait éventuellement à des densités d'ensemencement très faibles.

Figure 48 : Emplacement des frontières fixe (V) et mobile (T) bordant la zone avec chlamydospores à différents temps (en h) sur des gradients de densité d'ensemencement.



La densité cellulaire dans le gel augmente en fonction du temps, et on peut se demander s'il n'existe pas une densité cellulaire critique. Notre étude du déroulement de la morphogénèse nous a montré que la vague de chlamydosporulation est une vague secondaire. Les expériences de transfert dans l'eau nous ont montré que la vague primaire est en avance d'environ 3 heures. Nous pouvons, d'autre part, estimer le temps de latence au départ de la culture à environ 45 mn. La durée de croissance des thalles à un endroit du gradient avant le passage de la vague primaire est donc de  $(t_{(c,s)} - 3,75)$  heures. ( $t_{(c,s)}$  = heure d'apparition de la frontière à l'emplacement  $s$  dans le gradient). Si on estime que la croissance est exponentielle durant cette période le nombre de cellules au moment du passage de la vague primaire est de :

$$N_{(c,s)} = N_{(0,s)} e^{\mu(t_{(c,s)} - 3,75)}$$

( $N_{(0,s)}$  = densité cellulaire au temps 0 à l'emplacement  $s$  dans le gradient). Si on fait l'hypothèse d'une densité cellulaire critique,  $N_{(c,s)}$  est une constante :  $N_c$ . On peut écrire :

$$\ln N_{(0,s)} = -\mu(t_{(c,s)} - 3,75) + \ln N_c$$

et calculer par régression linéaire  $\mu$  et  $N_c$ . Voici les données :

$t_{(c,s)}$ heures	16	18	20	22	24
$t_{(c,s)} - 3,75$ h.	12,25	14,25	16,25	18,25	20,25
$N_{(0,s)}$ levures/ml	$7,7 \times 10^3$	$5,3 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$8,2 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$
$\ln N_{(0,s)}$	8,95	8,58	7,24	6,71	5,86

On obtient  $\mu = 0,40 \text{ h}^{-1}$ ,  $N_c = 1,21 \times 10^6$  cellules/ml avec un coefficient  $r = 0,99$ .

Le taux spécifique de croissance de  $0,40 \text{ h}^{-1}$  correspond à un temps de génération de 1 h 44 mn. Ce qui n'est pas impossible (nous avons estimé le temps de génération en eau de riz glucosée à 2 h ; l'expérience est ici réalisée en "Riz-Agar-Tween"). La densité cellulaire critique de  $1,21 \times 10^6$  cellules/ml est légèrement supérieure à la densité de levures à l'emplacement de la

frontière fixe ( $8,6 \times 10^5$  levures/ml) mais correspond assez bien à ce que l'on attend. Le paramètre temps pourrait ne cacher que la croissance cellulaire, et dans ce cas, il n'y aurait pas de stabilisation de la frontière.

Il faut remarquer cependant que, si une telle densité cellulaire critique existe, sa valeur dépend de celles des autres paramètres (anaérobiose, pH, température par exemple), c'est ce que prévoit la théorie des catastrophes et c'est ce que montrent les expériences en gradient d'anaérobiose réalisées avec différentes densités d'ensemencement. Les fronces que nous observons dans ces études morphogénétiques ne sont que des sections planes d'un ensemble de catastrophes plus compliqué qu'il faudrait déterminer.

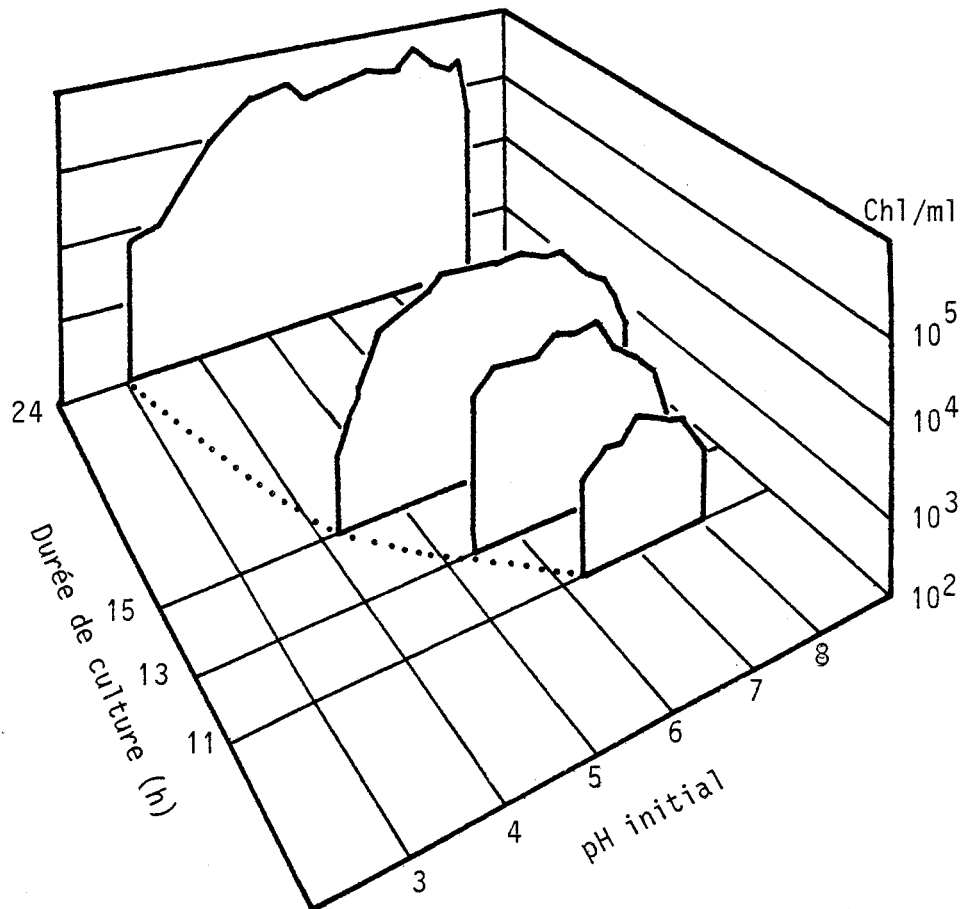
Avant de terminer ce paragraphe, il nous faut revenir sur l'interprétation de la figure 11 (paragraphe 2.2.1.1). Les courbes indiquent le nombre de chlamydospores observées par ml de milieu après 24 heures de culture en fonction de la densité d'ensemencement. Elles présentent un plateau pour les densités d'ensemencement  $> 7,8 \times 10^4$  levures/ml. Le rebord de ce plateau peut être interprété comme l'emplacement de la frontière (après 24 heures de culture) qui sépare la zone avec et sans chlamydospores en fonction de la densité d'ensemencement.

c. influence du pH initial : il a été difficile d'étudier les déplacements de frontière dans des gradients de pH. En effet, comme nous allons le voir, la frontière séparant les zones avec et sans chlamydospores se déplace en quelques heures d'un pH supérieur à 8 jusqu'à un pH inférieur à 4. Si on essaie de réaliser des gradients de pH en superposant une couche de milieu à pH basique et une couche à pH acide, et de suivre le déplacement de la frontière dans ces conditions, il semble que les chlamydospores apparaissent partout en même temps. Nous avons donc été amené à étudier l'influence du pH sur le déroulement de la morphogénèse dans des fioles, donc sans localisation géographique, nous n'avons pas réalisé véritablement de gradient de pH.

Le milieu de culture suivant a été utilisé :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 1 g ;  $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,2 g ;  $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$  : 0,05 g ;  $\text{FeCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$  : 0,002 g ;  $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,001 g ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  : 7,5 g ; glucose : 1 g ; biotine : 2,5  $\mu\text{g}$  ; eau bidistillée : 1000 ml. Différents pH sont obtenus en ajoutant soit HCl N soit NaOH N. Les cultures sont réalisées à 28°C en fiole de Legroux contenant 10 ml de milieuensemencé à l'aide de  $10^4$  levures/ml. L'inoculum est obtenu par culture de 24 heures à 37°C

sur milieu de Sabouraud gélosé. Le nombre de chlamydo-spores est déterminé par comptage dans des cellules de Nageotte. La figure 49 indique que les chlamydo-spores apparaissent plus tôt sur les milieux légèrement basiques puis de plus en plus tard sur les milieux de plus en plus acides. Pour un même pH, le nombre des chlamydo-spores augmente en fonction du temps ; la frontière devient de plus en plus nette, de plus en plus profonde, ce qui est prévu par la théorie.

Figure 49 : Nombre de chlamydo-spores de *Candida albicans* par ml de milieu (chl/ml) en fonction du pH initial du milieu et de la durée de culture. La figure met en évidence une vague de chlamydo-sporulation (.....). On observe également une frontière fixe du côté des pH basiques.



On n'obtient aucune croissance dans le milieu de pH le plus élevé que nous avons essayé (pH 8,7). A pH 8,3, la croissance est faible mais on observe des chlamydo-spores.



Il faut aussi signaler que pour les pH < 4,75 la transformation levure-pseudomycélium ne se réalise pas à 100 %. Seulement 10 à 20 % des levures ensemencées aux pH 3,25, 3,5 ou 4,25 et 50 % des levures ensemencées à pH 4,75 se transforment en pseudomycélium, les autres levures ensemencées se multiplient sous forme levure. Les thalles pseudomycéliens obtenus au pH 4,75 ont des articles plus allongés que ceux formés au pH plus élevé ; ils produisent des chlamydospores dans les cultures de 24 heures.

### 3.2.3. LE SYSTEME EST LE CONTENU DE LA FIOLE DE CULTURE.

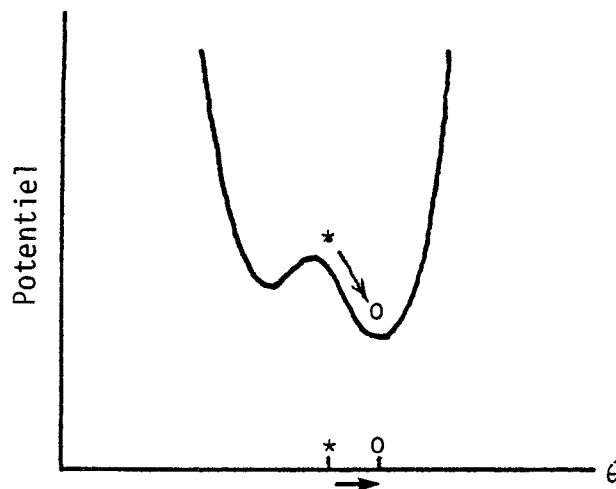
Nous l'avons dit, si le système est le "contenu de la fiole", ce système est "fabriqué" au temps  $t = 0$  et il est alors loin de sa position d'équilibre. Les variables, qui vont évoluer en fonction du temps pour se placer sur une position d'équilibre, sont nombreuses : concentrations des constituants du milieu de culture, concentration d'oxygène dissous, concentration des ions  $\text{HCO}_3^-$ , concentration de produits de métabolisme, biomasse et différentes variables caractérisant le microorganisme. Les paramètres que l'on maintient constants durant la culture, sont la température, l'éclairage, les pressions d' $\text{O}_2$  et de  $\text{CO}_2$  au-dessus du milieu de culture...

Pour comprendre comment traiter ce problème, reprenons la machine de ZEEMAN.

3.2.3.1) analogie avec la machine de ZEEMAN : nous allons utiliser la machine de ZEEMAN d'une manière nouvelle : au temps  $t = 0$ , nous fixons les paramètres (nous plaçons l'extrémité C de l'élastique en un endroit donné) et nous choisissons une valeur de  $\theta$  (nous plaçons la roue dans une position que nous choisissons également) puis nous lâchons la roue ; nous observons sa rotation et son retour à une position d'équilibre. Quelle sera cette position d'équilibre ? Cette question est analogue à celle que nous nous posons pour l'interprétation des cultures : nous fixons les paramètres (température, etc...), nous choisissons une valeur initiale des variables (concentrations des constituants, etc...) et nous laissons évoluer le système vers une position d'équilibre. Quelle sera cette position d'équilibre ?

La machine de ZEEMAN est très simple puisqu'elle se décrit à l'aide d'une variable et de deux paramètres ; on représentera facilement la dynamique de ce système en traçant le potentiel au-dessus de l'espace de la variable (la forme de ce potentiel dépend bien sûr de la valeur des paramètres). On place sur cette courbe de potentiel un point correspondant à la valeur initiale de la variable et l'on comprend que ce point est attiré dans un puits de potentiel (figure 50).

Figure 50 : Retour à l'équilibre ; la valeur des paramètres est fixée et détermine la forme du potentiel. La variable est déplacée (\*) et retourne à l'équilibre (O).



Si l'on envisage un système décrit par deux variables, l'espace des variables est à deux dimensions et l'interprétation du système conduit à un modèle de type hydrologique : les deux dimensions des variables déterminent un plan au-dessus duquel on trace une surface définissant la valeur du potentiel ; on obtient ainsi un relief avec des sommets, des bassins, des lignes de crête, des cols. Au temps  $t = 0$ , les variables sont placées en un point du relief et elles vont évoluer en fonction du temps. On peut tracer la trajectoire du point sur le plan de l'espace des variables ; on appelle habituellement ce plan, le plan des phases. On comprend que ces trajectoires sont la projection sur l'espace des phases des lignes de plus grande pente sur le relief du potentiel. Pour reprendre le modèle hydrologique, elles représentent sur une carte les trajets des rivières dont la source serait située où on le désire. THOM (112) compare ce relief à celui de l'intérieur

d'un cratère. Le problème est de déterminer le bassin des attracteurs et les points de conflit entre attracteurs (lignes de crête, cols).

3.2.3.2) modèle "hydrologique" de la morphogénèse de *Candida albicans* : l'espace des variables, espace des phases de la culture, est de dimension assez grande, de toute façon de dimension supérieure à deux. Il n'est donc pas possible de le représenter sur une feuille de papier. Cependant, si on veut être concret et montrer comment un modèle hydrologique peut faciliter la compréhension de l'évolution des cultures en fonction du temps, il nous faut un dessin du relief supposé figurer la valeur du potentiel au-dessus de l'espace des phases. Nous imaginerons, de façon très caricaturale, que les cultures en fioles sont décrites à l'aide de deux variables seulement dont l'une est la morphologie : la figure 51 montre un aspect possible du modèle hydrologique. Deux fosses (deux puits de potentiels) correspondant aux morphologies levure et chlamyospore sont reliées chacune par une vallée à un même col qui serait le débouché d'un large bassin dont le fond, en pente douce vers le col, s'étend dans une région correspondant à la morphologie pseudomycélienne. Pour tenir compte de nos observations, nous dirons qu'au niveau du col, il existe une petite surface horizontale.

Nous avons placé la source des rivières (les conditions initiales des cultures) à 3 emplacements différents. Les trois emplacements correspondent à une morphologie levure car c'est ainsi que l'on ensemence les cultures.

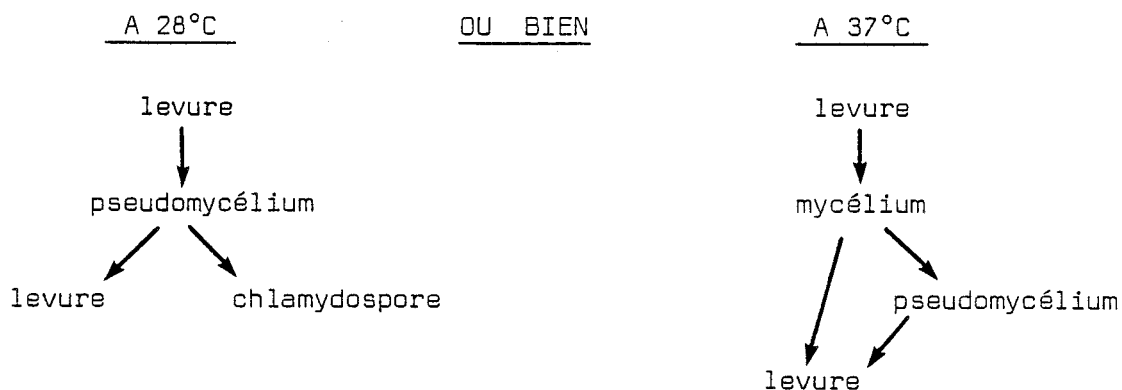
La rivière n° 1 (la culture n° 1) descend rapidement sur une pente abrupte puis plus lentement sur le plateau en pente douce vers le col (la levure se transforme en pseudomycélium puis se multiplie sous cette forme). Au col, la rivière se trouve sur une surface horizontale et deux vallées se présentent ; la rivière se divise en deux bras ; en ce qui concerne la culture, il y a une certaine indétermination au col (à cause de la petite surface horizontale), certains articles pseudomycéliens s'engageront dans la voie "production de chlamyospores", d'autres dans la voie "bourgeoisement de levures". En l'absence d'une surface horizontale au col, le choix de l'une ou l'autre voie serait déterminé par les conditions initiales.

La rivière n° 2 correspond à une culture ensemencée avec des levures identiques aux précédentes, mais dans un milieu différent (ou à une densité cellulaire différente) ; la morphologie reste levure durant toute la culture.

La rivière n° 3 correspond à une culture réalisée dans les mêmes conditions que la culture n° 1 maisensemencée avec des levures légèrement différentes (conditions de précultures différentes), la morphologie est levure durant toute la culture. C'est ce que l'on observe, par exemple, lorsqu'on ensemence de l'eau de riz glucosée avec des levures provenant d'une culture sur milieu de Sabouraud (condition n° 1) ou d'une culture éclairée dans de l'eau de riz glucosée (condition n° 3).

L'évolution de la culture est donc guidée par la valeur du potentiel et les variables tendent vers un équilibre qui réalise un minimum local de potentiel. Il s'agit donc de déterminer pour chaque minimum local de potentiel, un bassin d'attraction et de déterminer les zones de conflit entre deux attracteurs.

La forme du cratère de la figure 51 dépend de la valeur des paramètres : ainsi nous avons pu observer que pour des conditions initiales de culture identiques mais à deux températures différentes, 28°C et 37°C par exemple, nous observons les développements :



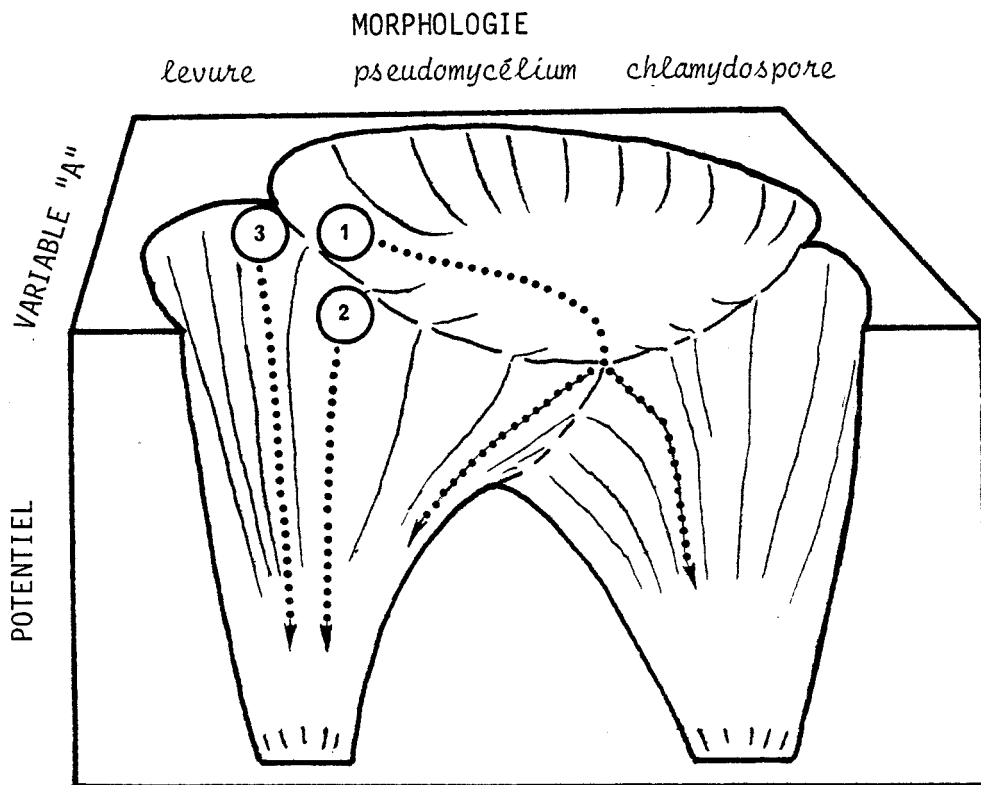
Déterminer les conditions favorables à la production des chlamydospores de *Candida albicans* c'est donc déterminer les valeurs des paramètres telles qu'il existe un minimum de potentiel correspondant à cette morphologie et déterminer également le bassin de cet attracteur, donc les conditions initiales permettant de rejoindre ce minimum de potentiel.

Remarquons que certaines morphologies apparaissent de manière transitoire : c'est le cas du pseudomycélium sur la figure 51. Les valeurs des paramètres sont telles qu'il n'existe pas de minimum de potentiel correspondant à cette morphologie, la culture ne peut pas être en équilibre, elle continue à évoluer en diminuant progressivement la valeur du potentiel.

Figure 51 : Modèle hydrologique de l'évolution des cultures en fioles : les cultures évoluent en minimisant une fonction de potentiel. Des conditions initiales légèrement différentes conduisent à des développements très différents.

Conditions 1 et 3 : des levures légèrement différentes obtenues par exemple sur milieu de Sabouraud (1) ou milieu "eau de riz glucosée" à la lumière (3) sont ensemencées dans les mêmes conditions.

Conditions 1 et 2 : des levures identiques sont ensemencées dans des conditions légèrement différentes ; sur le mode 1 de développement il existe une petite surface horizontale au niveau du col d'où une indétermination : certains articles pseudomycéliens évoluent vers la forme levure, d'autres vers la forme chlamydo-spore.



Les conditions initiales concernent en particulier les concentrations des éléments constitutifs du milieu et dans l'étude de nombreux phénomènes morphogénétiques en culture, on s'efforce de trouver des règles pour l'élaboration des milieux de culture ; on parle de l'équilibre du milieu ; parmi les "règles" on évoque souvent, à propos de la reproduction sexuée des Champignons par exemple, un rapport carbone-azote à respecter. Selon notre interprétation, ces règles tentent de définir dans un espace multidimensionnel un ensemble de points constituant le bassin d'un attracteur et évitant les régions de l'espace où cet attracteur est en conflit avec un autre attracteur ;

dans ces régions de conflit, en effet, l'avenir des cultures est incertain, les résultats ne sont reproductibles que statistiquement.

Très souvent le minimum de potentiel est atteint pour une valeur très faible de l'un des constituants du milieu de culture que l'on appelle facteur limitant. La croissance s'arrête lorsque le facteur limitant est épuisé. Ce n'est pas toujours le cas.

Même lorsque la croissance s'arrête pour une valeur très faible de substrat, on peut, en milieu liquide, séparer le milieu de la biomasse par filtration, réensemencer le filtrat et obtenir une nouvelle croissance faible certes, mais non nulle.

Les expériences de ce type, réalisées par LACOSTE (56), montrent que non seulement on observe une croissance mais encore une différenciation, une production de périthèces chez *Leptosphaeria typhae* : lors de la première culture, le système s'était placé sur une position d'équilibre, la filtration et le réensemencement réalisent un nouveau système dans une position de déséquilibre et par conséquent une nouvelle évolution ; une nouvelle croissance a lieu pour retrouver une position d'équilibre. Il nous semble préférable de parler de cette position d'équilibre du système pour évoquer la fin de la croissance plutôt que de parler d'épuisement de milieu de culture, ce qui rend inexplicable la seconde croissance.

Bien sûr, ce modèle à deux variables est caricatural. Pour être plus fidèle, il devrait tenir compte d'un plus grand nombre de variables. Une autre imperfection tient au fait que nous avons réuni de manière abusive, tout ce qui évolue dans l'espace des variables : en réalité il faudrait prendre en considération la rapidité de la dynamique, établir une hiérarchie des dynamiques, les facteurs à dynamique lente jouant le rôle de paramètres pour les variables à dynamique rapide ; cela revient à réintroduire la durée de culture dans l'espace des paramètres et donc à envisager une déformation continue de la forme du cratère de potentiel. Malgré ses imperfections évidentes, le modèle hydrologique présenté ici permet de comprendre comment, à l'aide d'un potentiel qui évolue vers un minimum, on peut décrire l'évolution morphologique des cultures.

### III.3 MORPHOGENESE DE CANDIDA ALBICANS EN CULTURE CONTINUE

La théorie des catastrophes, bien qu'elle se veuille une théorie dynamique de la morphogénèse, décrit en fait les équilibres possibles d'une variable ; si elle est aussi une théorie dynamique, c'est parce qu'elle indique comment les variations continues des paramètres conduisent à des ruptures d'équilibre.

Si nous devenons maître des paramètres, si nous pouvons les fixer et les rendre indépendants du temps, nous pourrons maintenir un équilibre. Si ensuite nous faisons varier progressivement (et selon notre volonté) ces paramètres, nous pourrons obtenir des changements d'équilibre. Si, enfin, ces équilibres sont les différentes morphologies de *Candida albicans*, nous serons devenu maître de la morphogénèse de cette espèce. Voilà notre espoir, ou notre rêve.

Il s'agit donc de construire un système qui soit un mode de culture et qui puisse se placer sur des positions d'équilibre indépendantes du facteur temps. De tels systèmes ont déjà été décrits, ce sont les cultures continues.

Avant de rapporter les résultats de nos travaux, nous indiquerons les principes de la culture continue et montrerons que certains phénomènes connus peuvent s'interpréter à l'aide de la théorie des catastrophes.

#### 3.3.1. PRINCIPES DE LA CULTURE CONTINUE.

Il existe de nombreuses techniques de culture continue. Celle qui nous intéresse est la culture continue homogène ouverte : un récipient, que l'on nomme habituellement fermenteur, contient un volume  $V$  de culture. Cette culture peut être caractérisée par la concentration de la biomasse  $X$ , et la concentration des différents constituants du milieu  $S_i$ . On ajoute constamment du milieu de culture neuf, dont la concentration des constituants est  $S_{i0}$ . Le milieu neuf est ajouté selon un débit  $F$  (volume par unité de temps), et immédiatement mélangé au contenu du récipient (d'où la dénomination culture continue homogène) ; on prélève constamment la culture selon le même débit  $F$ . Le volume  $V$  est donc constant. Dans certains types de culture continue, une partie

ou la totalité de la biomasse est recyclée dans le récipient. Ce n'est pas le cas lorsqu'on parle de culture ouverte. La théorie de ce type de culture a été décrite par MONOD (68).

Généralement on utilise un constituant du milieu de culture en concentration limitante et le système est appelé 'Chemostat'. Dans ce cas, on néglige dans la description du système les concentrations des constituants du milieu autre que le constituant limitant (on nomme  $S$  et  $S_0$ , sa concentration respectivement dans le fermenteur et dans le milieu d'alimentation).

Le système peut alors être décrit pour une série d'équations différentielles. Il évolue vers une position d'équilibre :

Si  $\mu$  est la vitesse spécifique de croissance du microorganisme

$$\left( \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \right)$$

Si  $D$  est le taux de dilution

$$\left( D = \frac{F}{V} \right)$$

Et si  $Y$  est le rendement (biomasse produite par masse de substrat consommé)

on peut écrire (en faisant des bilans)

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D) X$$

et

$$\frac{dS}{dt} = D (S_0 - S) - \frac{\mu X}{Y}$$

$$\text{à l'équilibre} \quad \frac{dX}{dt} = 0 \quad \text{et} \quad \frac{dS}{dt} = 0$$

$$\begin{aligned} \text{d'où} \quad \mu &= D \\ X &= Y (S_0 - S) \end{aligned}$$

On constate également que la valeur de  $D$  est limitée supérieurement, autrement dit il existe un taux de dilution critique  $D_c$  au-delà duquel le système évolue vers un autre équilibre où  $X = 0$  ; c'est ce qu'on appelle le "Wash-out". Par conséquent il existe une valeur maximum de  $\mu$  appelée  $\mu_{\max}$ .



MONOD a établi une relation (semblable à l'équation de MICHAELIS) entre  $\mu$ ,  $\mu_{\max}$  et  $S$  et introduit la constante  $K_s$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

Dans la pratique, le fermenteur est aéré, et sa température est contrôlée.

Si nous utilisons toujours la même terminologie, nous considérons comme système le contenu du fermenteur. Nous pouvons observer des sorties : les variables  $X$ ,  $S_i$  (ou  $S$  si on ne s'intéresse qu'au facteur limitant).

Nous avons à notre disposition des entrées : ce sont les paramètres  $F$  (plutôt que  $D$  dont la définition fait appel à  $V$ )  $S_{i0}$  (ou seulement  $S_0$  si on le désire), la température, les paramètres de la ventilation (débit des différents gaz, vitesse de rotation de l'agitateur éventuellement).

L'examen des relations citées plus haut montrent que l'on peut, dans une certaine limite, choisir la vitesse spécifique de croissance du microorganisme : c'est bien sûr une vitesse spécifique de croissance moyenne ; chez *Saccharomyces cerevisiae*, par exemple, les cellules-mères se divisent plus rapidement que les cellules-filles et la différence est d'autant plus importante que le taux de dilution est faible (113).

On peut aussi montrer que l'on contrôle la biomasse ( $X$ ) dans le fermenteur à l'aide de  $S_0$  principalement et accessoirement à l'aide de  $F$ . On contrôle la concentration  $S$  du substrat dans le fermenteur à l'aide de  $F$ .

Nous venons de dire que la culture continue évolue vers un état d'équilibre (steady-state). On peut étudier la nature de cet équilibre en fonction des variations lentes et continues des paramètres externes ; mais on peut également perturber les variables (ajouter brutalement une certaine quantité de substrat dans le fermenteur par exemple) et observer le retour à l'équilibre ("transient-state"). On se limite habituellement à l'étude des deux variables  $X$  et  $S$  et on indique sur le plan ( $X, S$ ), appelé plan des phases, l'évolution simultanée des variables.

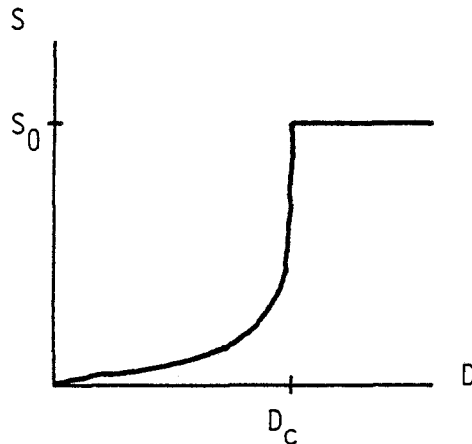
La technique de culture continue semble être un outil intéressant pour l'étude d'équilibres et changements d'équilibres et un domaine d'application de la théorie des catastrophes.

## 3.3.2. EXEMPLES DE CATASTROPHES EN CULTURE CONTINUE.

3.3.2.1) taux de dilution critique : soit  $S$  la variable et  $D$  le paramètre (nous utiliserons  $D$  conformément aux habitudes et contrairement à notre préférence pour  $F$  indiquée plus haut). Supposons notre culture en équilibre et augmentons progressivement  $D$ . Le graphe  $S = f(D)$  a généralement l'allure suivante (figure 52).

Figure 52 : Relation entre la concentration du substrat ( $S$ ) dans le fermenteur et le taux de dilution ( $D$ ).

$S_0$  = concentration du substrat dans le milieu.  
 $D_c^0$  = taux de dilution critique.

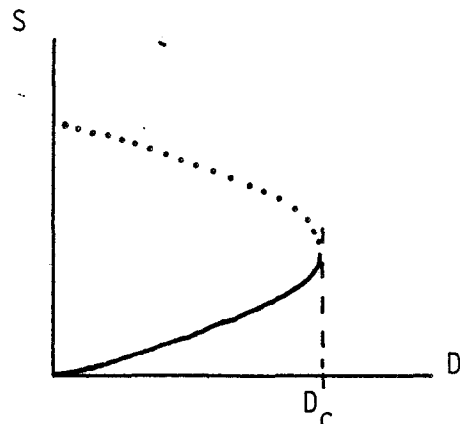


On pense pouvoir modéliser cette situation à l'aide d'un pli : voici un phénomène où on étudie une variable contrôlée par un paramètre et on observe un phénomène critique. Mais s'agit-il véritablement d'un phénomène discontinu ? Il semble que très souvent, en s'approchant très près de  $D_c$ ,  $S$  s'approche très près de  $S_0$ .

Voyons cette situation plus en détail : supposons que nous ayons un pli et traçons  $S = f(D)$ . On doit obtenir une courbe du type (figure 53).

Figure 53 : Relation entre  $S$  et  $D$  dans l'hypothèse où  $D_c$  est un point pli.

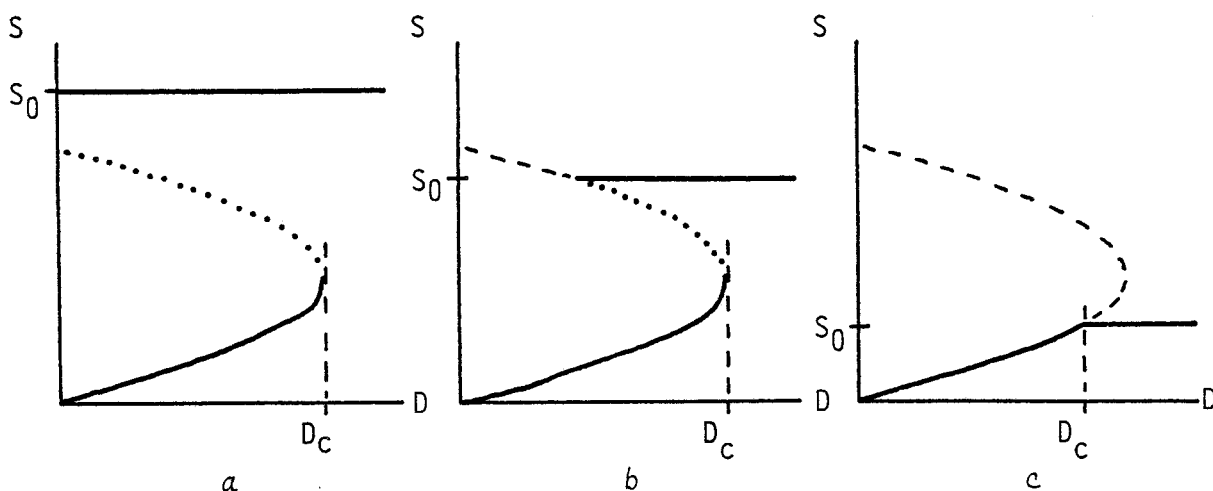
— : attracteur  
 ..... : répulseur.



Pour  $D > D_c$ , la valeur de  $S$  doit être infinie ; il est bien évident que cela est impossible.  $S$  est obligatoirement inférieur ou égal à  $S_0$ , ce que nous avons noté sur la figure précédente. Nous avons une contrainte ; voyons comment elle intervient en plaçant  $S_0$  à différentes valeurs (figure 54).

Figure 54 : Relation entre  $S$  et  $D$  ; hypothèse du pli avec contrainte :  $S < S_0$ . Influence de la valeur de  $S_0$ .

— : attracteur  
 ..... : répulseur.

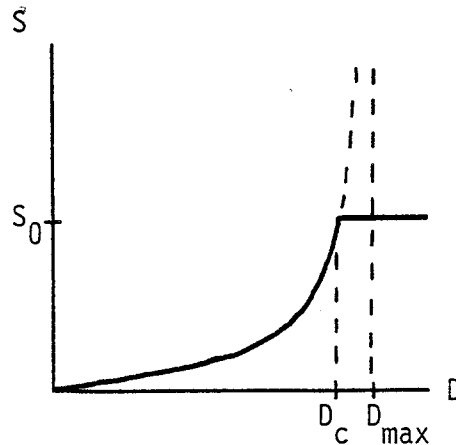


En (a) et (b), nous observons une variation brutale de  $S$  lorsque  $D$  devient supérieur à  $D_c$ . Par contre en (c) nous n'observons plus le même type de catastrophe ; nous observons une "constraint catastrophe" (81). Cet exemple montre la prudence avec laquelle il faut utiliser la théorie, et surtout mener les observations.

Généralement, les résultats expérimentaux semblent correspondre au cas (c) de la figure 54, et la question se pose : le point  $D_c$  peut-il être un point pli ? Si la relation de MONOD  $\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K + S}$  est exacte, la réponse est négative. En effet à l'équilibre  $D = \mu^S$  et le graphe  $S = f(D)$  est une hyperbole. Quel que soit  $S_0$ ,  $D_c$  est inférieur à  $D_{\max} (= \mu_{\max}^S)$  ; il n'y a jamais de variation brutale de  $S$  à  $D_c$  (figure 55).

Figure 55 : Relation entre  $S$  et  $D$  ; hypothèse de la relation de MONOD.

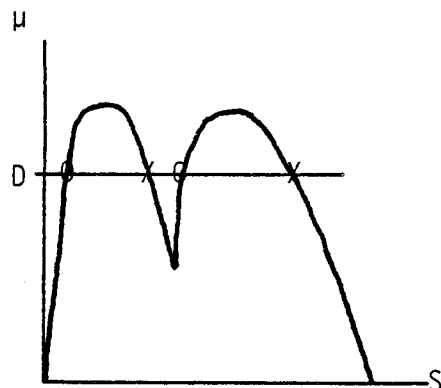
$D_c$  = taux de dilution critique  
 $D_{max}$  = taux de dilution maximum.



Il semble cependant que la relation de MONOD soit une approximation et qu'en fait la courbe  $\mu = f(S)$  passe par un maximum : une concentration trop importante de substrat est inhibitrice. Dans ce cas  $D_c$  peut être un point pli si  $S_0$  est suffisamment élevé (cas (a) ou (b) de la figure 54).

3.2.2.2) états d'équilibre multiples : RUSSELL et TANNER (88) ont analysé les états d'équilibre multiples en culture continue lorsque la courbe de croissance du microorganisme est bimodale. Ils ont plus particulièrement étudié le cas de *Saccharomyces cerevisiae* cultivé en présence de glucose. La courbe de la figure 56 indique le taux spécifique de croissance en fonction de la concentration de glucose en culture "batch".

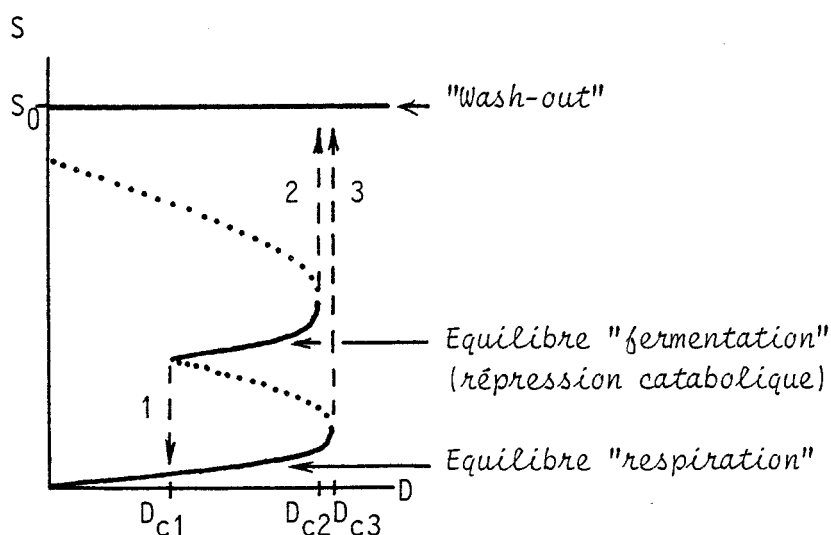
Figure 56 : Relation entre le taux spécifique de croissance ( $\mu$ ) et la concentration de glucose ( $S$ ) dans une culture "batch" de *Saccharomyces cerevisiae* ; positions d'équilibre stable (o) ou instable (x) dans le cas d'une culture continue au taux de dilution  $D$  (d'après RUSSEL et TANNER, 88).



Les auteurs ont montré, par l'étude des équations différentielles qui régissent les cultures continues, que pour certains taux de dilution on peut obtenir quatre états d'équilibre : deux états stables indiqués  $\circ$  sur la figure et deux états instables indiqués  $\times$ . Si nous remarquons qu'en culture continue,  $D$  est un paramètre, qu'à l'équilibre  $\mu = D$  et que nous remarquons également que la relation entre  $\mu$  ( $= D$ ) et la concentration du glucose est conservée en culture continue, nous pourrions retracer la figure 56 en permutant les axes (figure 57).

Figure 57 : Interprétation selon la théorie des catastrophes des états d'équilibre d'une culture continue de *Saccharomyces cerevisiae*.

: attracteur  
 .....: répulseur.



Il est bien connu que sur la figure 56, la première partie de la courbe, correspondant aux faibles concentrations de glucose, est liée à un métabolisme oxydatif de la levure tandis que la seconde partie de la courbe est liée à un métabolisme fermentaire, c'est un phénomène de répression catabolique, l'effet Crabtree.

La figure 57 suscite plusieurs remarques : tout d'abord selon la valeur de  $S_0$  on pourra observer ou non l'ensemble de la courbe. Ensuite, il faut attirer l'attention sur les catastrophes possibles : elles sont au nombre

de trois : deux "wash out", notés 2 et 3 sur la figure, qui se produisent lorsqu'on augmente  $D$  et qui dépendent de l'état antérieur du système : la catastrophe 2 ne se produira que si le système se trouve sur l'attracteur "fermentation", la catastrophe 3 que si l'on se trouve sur l'attracteur "respiration". La catastrophe 1 se produit lorsqu'on diminue  $D$  et elle correspond au passage de l'équilibre "fermentation" à l'équilibre "respiration". Nous constatons qu'il n'est pas possible d'atteindre l'équilibre "fermentation" à partir de l'équilibre "respiration" par changement du paramètre  $D$ . L'équilibre "fermentation" pourra être atteint par perturbation des variables si pour un taux de dilution  $D$  tel que  $D_{c1} < D < D_{c2}$  on ajoute brutalement dans le fermenteur du glucose de manière à amener  $S$  à une valeur comprise entre les deux répulseurs. L'équilibre "fermentation" pourrait aussi être atteint en faisant varier d'autres paramètres que  $D$  ; on peut suggérer par exemple les paramètres d'aération. La figure 57 ferait concevoir une modélisation à l'aide d'une queue d'aronde et rechercher trois paramètres de commande : le taux de dilution, un paramètre oxygénation et un troisième paramètre (peut-être  $S_0$  qui contrôle  $X$  et par conséquent la consommation d'oxygène).

D'autres publications ont été consacrées aux états d'équilibre multiples en culture continue (38, 127). Dans tous les cas, l'utilisation de la théorie des catastrophes donnerait une description rapide du phénomène comme pour l'étude de la machine de ZEEMAN par exemple.

### 3.3.3. ETUDES MORPHOGENETIQUES EN CULTURE CONTINUE.

Quelques études concernant la morphogénèse de Champignon ou de bactéries ont été réalisées en culture continue : SHEPHERD et SULLIVAN (97) ont obtenu les formes levure et mycélium de *Candida albicans* en culture continue, mais dans des milieux ne contenant pas la même source carbonée ; en fait, ils obtiennent deux morphologies mais pas la transformation morphologique en culture continue.

PACKER et BERSTEN (75) ont étudié deux formes de *Trigonopsis variabilis* en culture continue. Ils obtiennent la forme triangulaire dans un milieu contenant de la méthionine, à 25°C, et avec une concentration d'oxygène de 230  $\mu\text{M}$  (notons que pour nous cette concentration est une variable et

non un paramètre). Dans d'autres conditions étudiées : milieu sans méthionine, température de 30°C ou concentration d'oxygène de 32  $\mu\text{M}$  (obtenue en utilisant un mélange à 5 % d'oxygène et 95 % d'azote pour la ventilation ; le paramètre est donc la proportion d'oxygène), ils obtiennent la forme ellipsoïdale. Il semble que ces deux formes ont été obtenues dans des cultures successives et non dans une même culture dont on aurait fait varier progressivement un paramètre pour passer d'un équilibre à un autre.

DAWES et MANDELSTAM (16) ont montré que la sporulation de *Bacillus subtilis* en culture continue dépend, entre autres facteurs, du taux de dilution, mais il n'y a pas de seuil : à une variation continue du taux de dilution correspond une variation également continue du nombre de spores par unité de volume. Un résultat identique est retrouvé par NG et Coll. (70) chez *Aspergillus niger* en ce qui concerne la conidiogénèse.

L'étude de la taille des cellules de *Geotrichum candidum* par ROBINSON et SMITH (87) indique également une variation continue de cette variable pour des variations continues du taux de dilution.

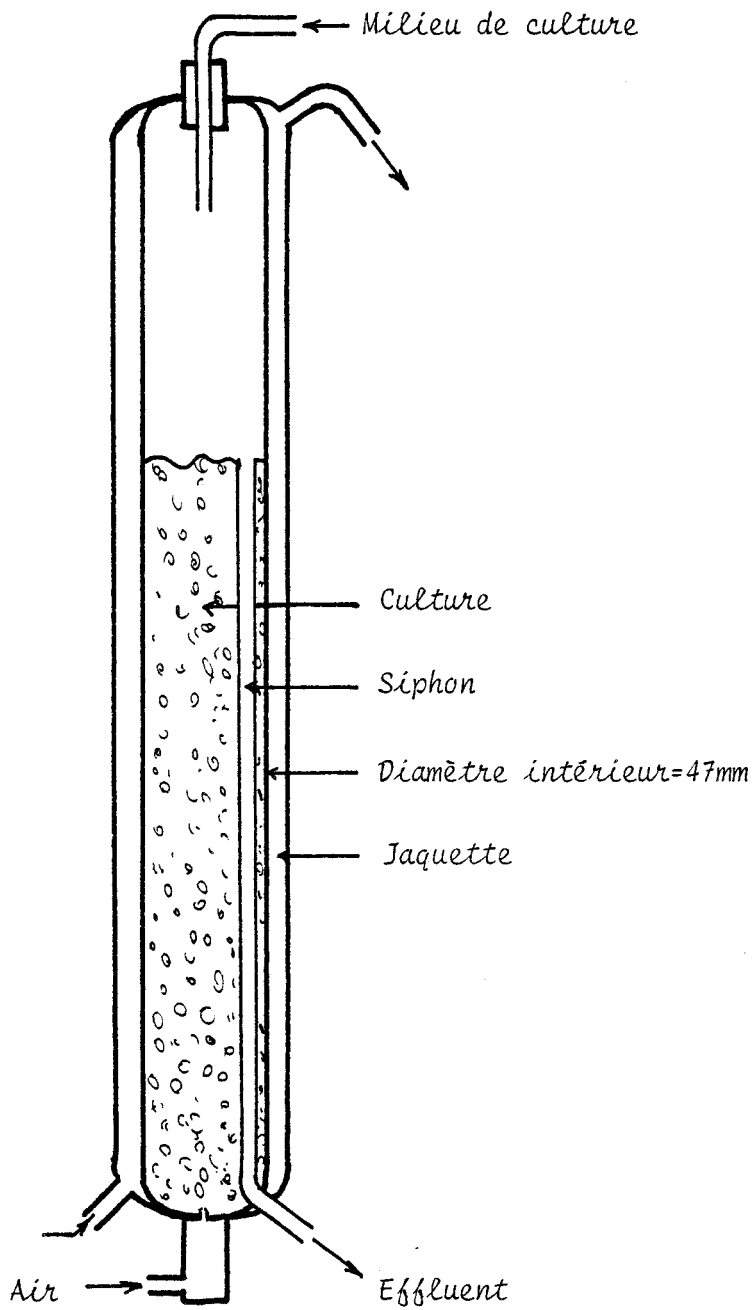
#### 3.3.4. TRAVAUX PERSONNELS.

Bien que nous ayons consacré beaucoup de temps et fourni un effort important, nous ne sommes pas parvenu à réaliser le rêve dont nous parlions : devenir maître de la morphogénèse de *Candida albicans*.

La première étape vers le but à atteindre était d'obtenir les différentes formes de *Candida albicans*, en culture continue, dans des conditions qualitativement identiques. C'est cette première étape que nous n'avons pas encore réussi à franchir. Ensuite, la seconde étape aurait consisté à déterminer l'ensemble de catastrophes en faisant varier quantitativement les paramètres.

En raison de nos travaux antérieurs, consacrés à la chlamydosporulation, c'est cette morphogénèse qui nous intéressait le plus et que nous souhaitions obtenir en culture continue. Le hasard a voulu que nous obtenions plus facilement la transformation levure-mycélium (23). En effet, dans un

Figure 58 : Fermenteur pour la culture continue, modèle 1.





moment de découragement nous avons augmenté la température d'un fermenteur qui, comme tous ses prédécesseurs, s'était placé en équilibre levure, et nous avons observé une catastrophe tant attendue. Cela nous a redonné courage mais ne nous a pas pleinement satisfait.

3.3.4.1) transformation levure ↔ mycélium : le fermenteur (figure 58) utilisé pour cette étude est constitué d'une colonne de verre pyrex de 47 mm de diamètre intérieur. Le contrôle de la température est assuré par circulation d'eau à l'intérieur d'une jaquette. De l'air est injecté au bas de la colonne à travers un tube capillaire de 1 mm de diamètre selon un débit de 3 l/mn. Le volume de culture dans le fermenteur est maintenu constant par l'intermédiaire d'un siphon ; il est de 500 ml. Le débit du milieu est de 130 ml/h, le taux de dilution est donc de  $0,26 \text{ h}^{-1}$ . Le milieu utilisé est de type optimisé : glucose : 0,31 g/l ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  : 0,023 g/l ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0,10 g/l ;  $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$  : 0,020 g/l ;  $\text{CaCl}_2,2\text{H}_2\text{O}$  : 0,005 g/l ;  $\text{FeCl}_2,4\text{H}_2\text{O}$  : 0,20 mg/l ;  $\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$  : 0,060 mg/l ; biotine : 0,25  $\mu\text{g/l}$  ; NaOH N : 1 ml/l.

Si le fermenteur est ensemencé dans ces conditions avec le clone 6311.5 de *Candida albicans* à 28°C à raison de  $10^4$  levures/ml on obtient transitoirement un développement de pseudomycélium, production de quelques chlamydospores puis l'équilibre s'établit sous forme levures. Si on augmente alors la température par paliers de 3°C, en attendant que l'équilibre s'établisse à chaque palier, on observe une transformation levure → mycélium lorsqu'on augmente la température de 31 à 34°C. La transformation inverse, mycélium levure, est obtenue lorsqu'on baisse la température de 34 à 31°C.

Le résultat de cette expérience est important, car il montre que l'on peut contrôler la transformation levure ↔ mycélium par des variations continues (quantitatives) des paramètres. Malheureusement, nous n'avons pas déterminé l'ensemble de catastrophes. Nous obtenons, ici, les transformations inverses dans un écart de température de 3°C. Il aurait été très intéressant de montrer que les deux transformations ne se font pas à la même température (hystérésis) ; mais dans un si petit écart de température, cela ne serait pas facile. Selon d'autres observations, il nous semble que le pH du milieu envoyé dans le fermenteur et le débit du milieu (taux de dilution) interviennent dans le phénomène de transformation levure ↔ mycélium et il est probable qu'en modifiant pH ou débit on pourrait augmenter le phénomène

d'hystérésis, séparer davantage les deux températures de transformation. Cette étude reste à faire. Nous étions trop préoccupé par la transformation en chlamydo-spores et nous n'avons pas consacré de temps à la transformation levure  $\longleftrightarrow$  mycélium.

3.3.4.2) évolution vers l'équilibre des cultures continues à 28°C : nous ne présenterons que quelques résultats :

Nous avons souvent utilisé un fermenteur semblable au précédent mais dans lequel l'air est envoyé à travers un verre fritté n° 3 d'un diamètre de 26 mm. Ce mode d'aération est contre-indiqué si l'on veut produire du mycélium de *Candida albicans* car celui-ci réussit à s'accrocher sur le verre fritté et à croître dans les pores empêchant ainsi l'aération.

Voici un résultat obtenu dans un tel fermenteur contenant 500 ml de culture,ensemencé à l'aide de  $5 \times 10^6$  levures ( $10^4$  levures/ml) à une température de 28°C. Le débit du milieu était de 25 ml/h ; le milieu avait la même composition que précédemment sauf la concentration de NaOH (0,5 ml NaOH N/1). L'effluent était récolté sur du formol dans les tubes d'un collecteur de fraction. Nous avons déterminé dans des fractions correspondant à des durées de 1 heure le nombre de cellules par thalle (figure 59).

Figure 59 : Nombre de cellules par thalle de *Candida albicans* cultivé en culture continue dans les premières fractions recueillies après l'ensemencement. Chaque fraction correspond à l'effluent récolté pendant 1 heure.

débit d'air :  $\square$  3 l/mn ;  $\blacktriangle$  0,5 l/mn.

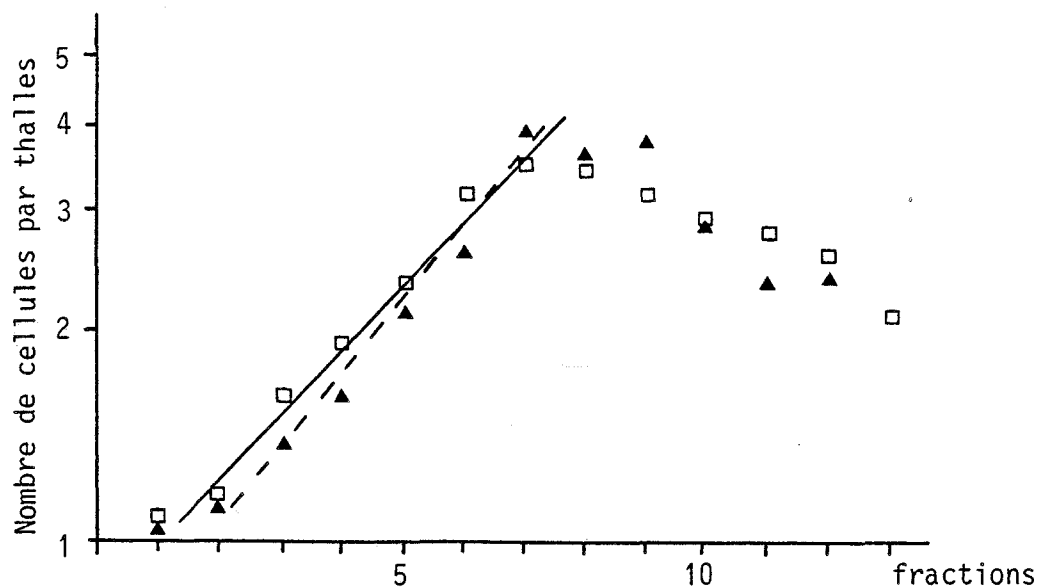
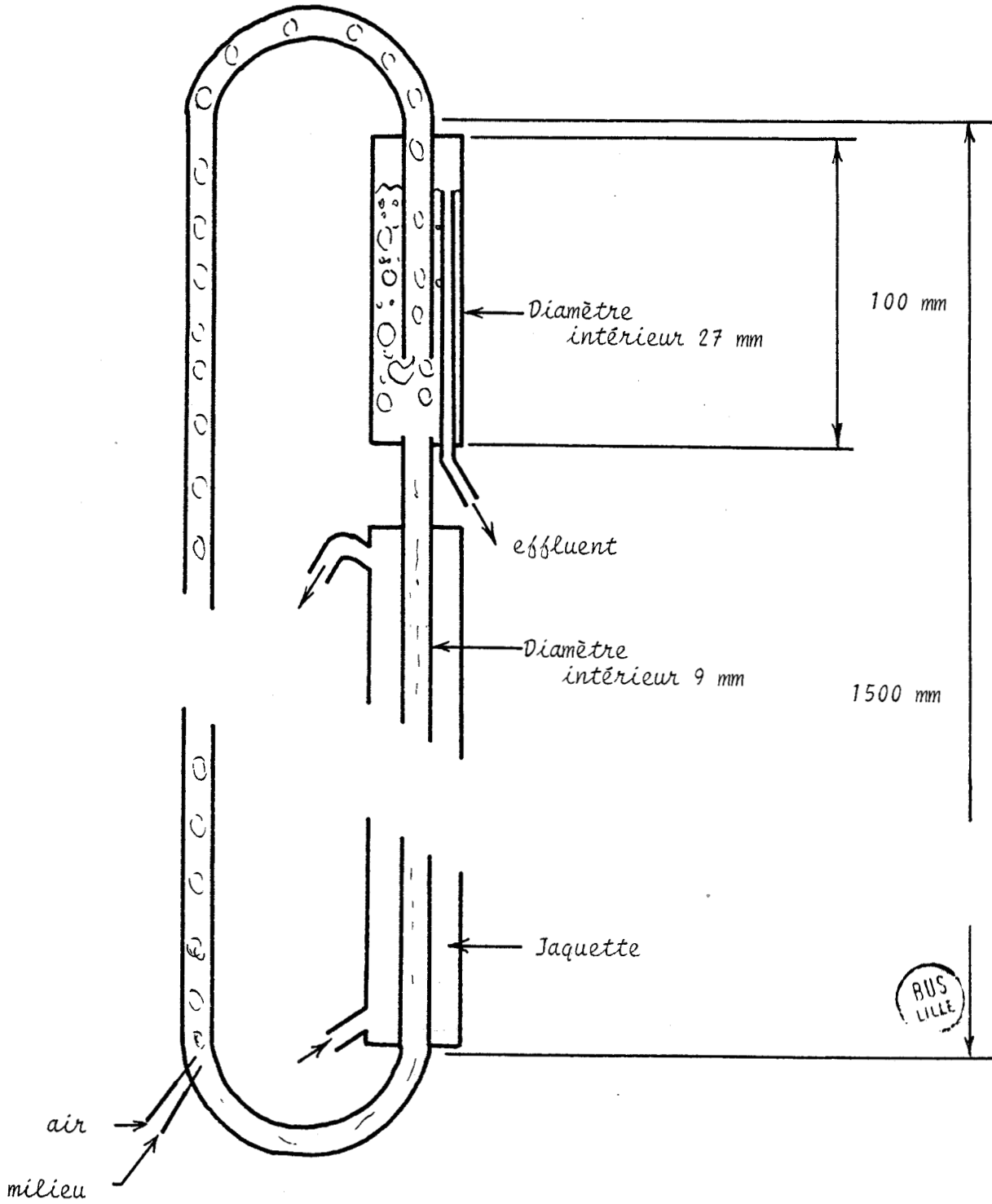


Figure 60 : Fermenteur pour la culture continue,  
modèle 2.



Pendant les 7 premières heures, le nombre de cellules par thalle augmente de manière exponentielle ; le taux spécifique de croissance est estimé à  $0,22 \text{ h}^{-1}$ . Puis ce nombre de cellules par thalle diminue car les jeunes thalles pseudomycéliens bourgeonnent des levures qui se détachent. Dans la fraction correspondant à la 14ème heure on trouve néanmoins un thalle pseudomycélien à 9 cellules, un autre à 15 et un autre à 16 cellules pour 131 thalles dénombrés dans 0,01 ml. Cela montre que si la plupart des cellules bourgeonnent des levures, certains thalles pseudomycéliens continuent à se développer sous forme de pseudomycélium. Ces thalles produisent même un peu plus tard des chlamydo-spores, mais ils finissent par être éliminés complètement, et à l'équilibre on n'observe plus que des levures.

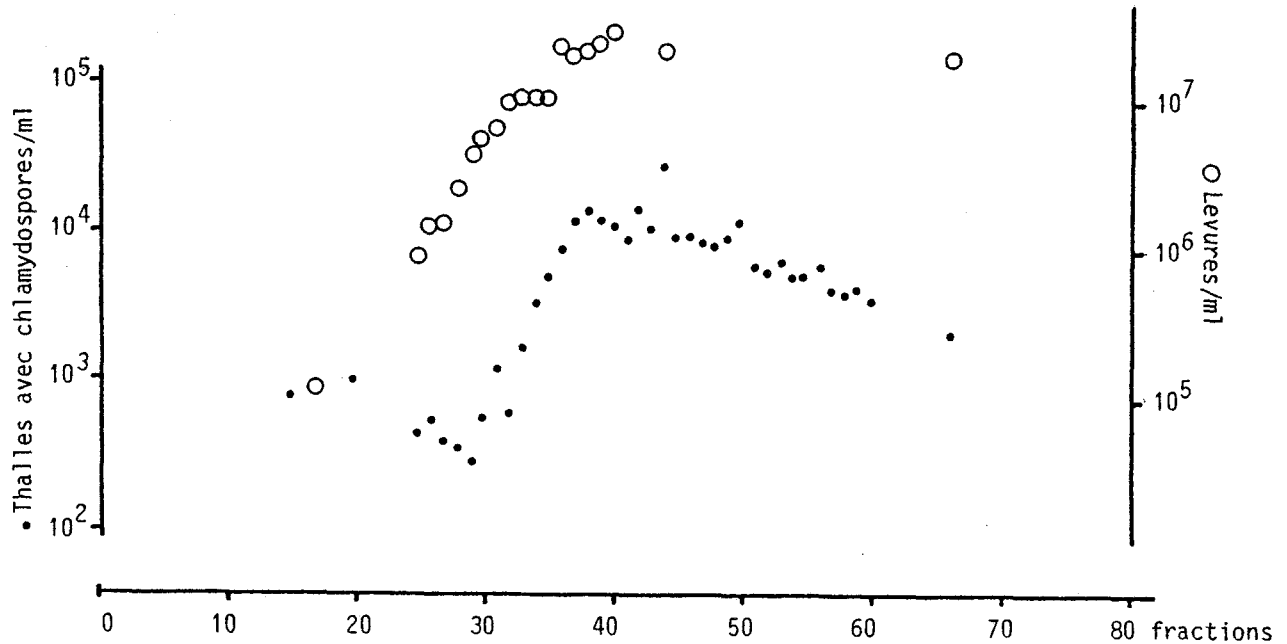
Un résultat identique est obtenu si on réduit le débit d'air ( $0,5 \text{ l/mn}$ , figure 59). Par contre, si le débit d'air est de  $0,5 \text{ l/mn}$ , mais que l'inoculum est de  $10^7$  levures/ml, on observe que la moitié environ des levuresensemencées produisent un tube germinatif et par conséquent s'orientent vers le mycélium. A l'équilibre, la morphologie sera néanmoins levuriforme.

Nous avons fait varier de nombreux paramètres. Voici un résultat obtenu dans un autre type de fermenteur avec un autre milieu :

Le fermenteur est constitué d'une anse tubulaire. La figure 60 en indique la forme et les cotes. L'air est injecté au bas de la branche ascendante à travers une aiguille biseautée d'un diamètre extérieur de 0,8 mm. Avec un débit d'air de  $1,5 \text{ l/mn}$ , le volume de la culture est de 180 ml. Le milieu avait la composition suivante : galactose : 0,31 g/l ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  : 0,750 g/l ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0,1 g/l ;  $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$  : 0,020 g/l ;  $\text{CaCl}_2,2\text{H}_2\text{O}$  : 0,005 g/l ;  $\text{FeCl}_2,4\text{H}_2\text{O}$  : 0,20 mg/l ;  $\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$  : 0,060 mg/l ; biotine : 0,25  $\mu\text{g/l}$  ; NaOH N : 2 ml/l ; débit de milieu : 19,5 ml/h ; température :  $28^\circ\text{C}$  ; densité d'ensemencement :  $10^4$  levures/ml.

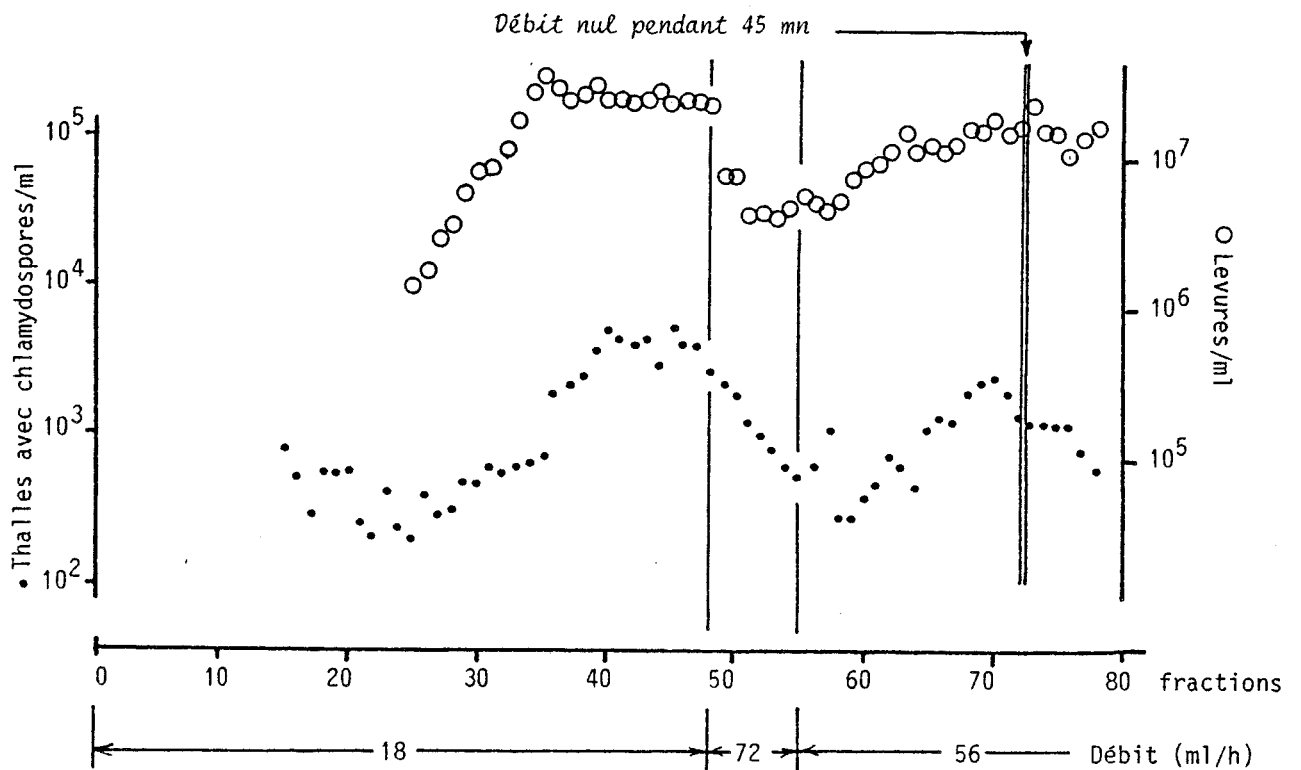
L'effluent est récolté heure par heure grâce à un collecteur de fractions. La figure 61 indique l'évolution du nombre de levures et de thalles pseudomycéliens en fonction du temps. Après 36 heures de culture, un équilibre est atteint en ce qui concerne le nombre des levures, mais alors commence l'élimination des thalles porteurs de chlamydo-spores.

Figure 61 : Evolution du nombre de levures (O) et de thalles avec chlamydozoospores (.) dans l'effluent d'un fermenteur en culture continue ; chaque fraction correspond à l'effluent récolté pendant 1 heure (voir les conditions dans le texte).



L'expérience a été reprise, et nous avons fait varier le débit de milieu de culture après une dizaine d'heures de "pseudoéquilibre" (équilibre du nombre des levures). L'augmentation très forte du débit de milieu pendant 7 heures diminue la population de levures et élimine une partie des thalles pseudomycéliens (figure 62). Le retour à un débit plus faible permet une nouvelle augmentation du nombre des levures mais aussi du nombre de thalles avec chlamydozoospores suivie d'une élimination. Il n'a pas été possible d'obtenir un équilibre dans lequel les thalles soient tous formés de "chlamydozoospores", c'est à dire de cellules semblables aux chlamydozoospores mais capables de bourgeonner des cellules identiques à elles-mêmes. Il est évident que si les cellules ne se multiplient pas elles sont éliminées en culture continue. Dans notre système, les thalles porteurs de chlamydozoospores ne proviennent pas forcément de thalles identiques. Il nous semble même, sans que nous puissions l'affirmer, que ces thalles sont produits par des levures.

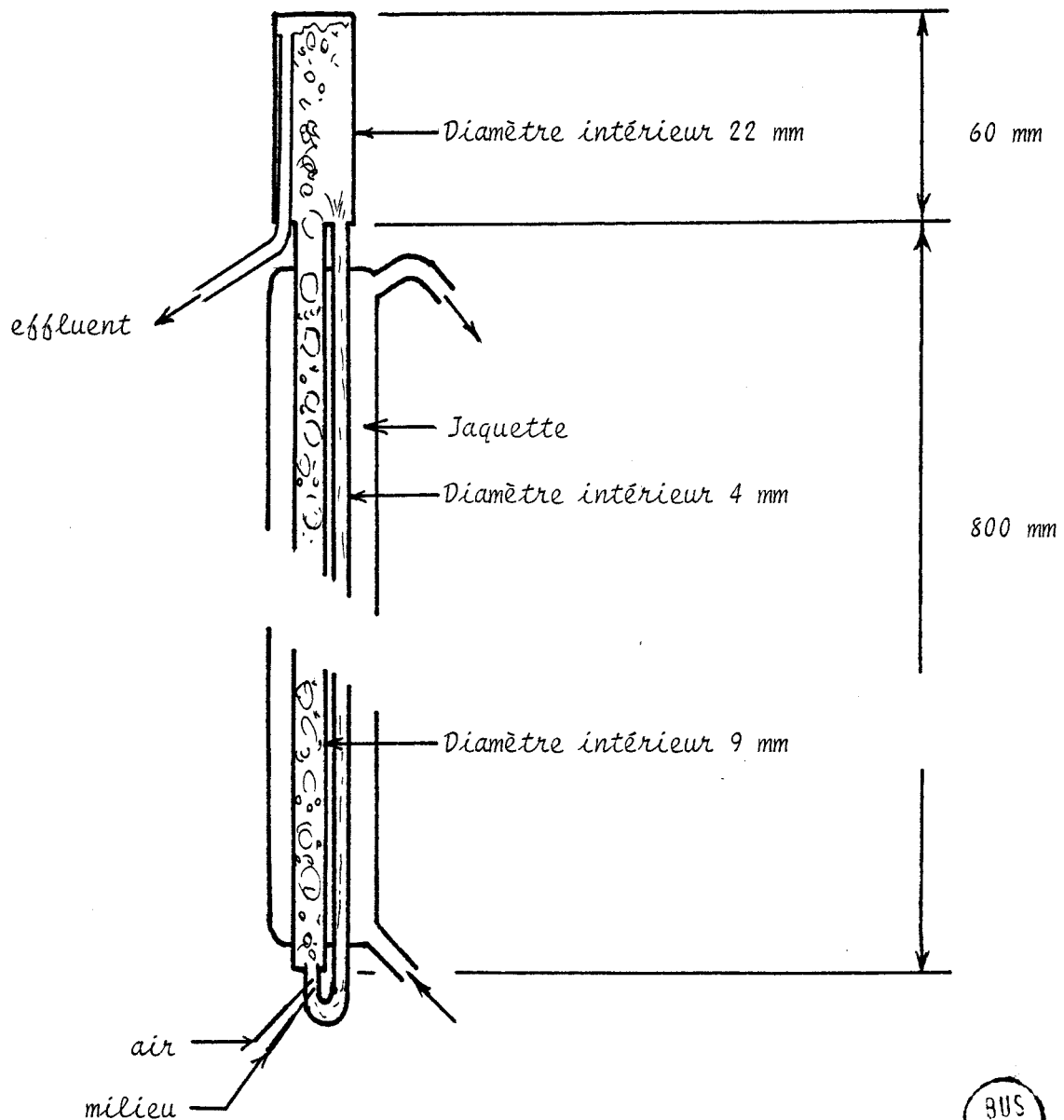
Figure 62 : Evolution du nombre de levures (O) et de thalles avec chlamydozoaires (.) dans l'effluent d'un fermenteur en culture continue ; chaque fraction correspond à l'effluent récolté pendant 1 heure (voir les conditions dans le texte).



3.3.4.3) obtention de chlamydozoaires en état d'équilibre : c'est le meilleur résultat que nous ayons pu obtenir : à l'équilibre, la culture est constituée de levures et de thalles porteurs de chlamydozoaires en nombre constant (environ  $2 \times 10^4$ /ml).

Les conditions sont les suivantes : fermenteur du type anse tubulaire avec les cotes de la figure 63 ; milieu de culture : glucose : 0,1 g/l ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 1 g/l ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,2 g/l ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : 0,05 g/l ;  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  : 0,002 g/l ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,001 g/l ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  : 7,5 g/l ; biotine : 2,5  $\mu\text{g/l}$  ; NaOH N : 5 ml/l ; débit d'air : 0,750 l/mn ; débit de milieu : 20 ml/h ; température : 28°C ; ensemencement :  $4 \times 10^7$  levures pour le fermenteur.

Figure 63 : Fermenteur pour la culture continue ,  
modèle 3.



Le résultat que nous obtenons est du type de celui décrit par DAWES et MANDELSTAM (16) chez *Bacillus subtilis* ; à l'équilibre le milieu contient un mélange de deux formes.

3.3.4.4) discussion : il ne nous a pas été possible d'obtenir des équilibres, en culture continue, constitués uniquement de pseudomycélium ou de "chlamydospores". Cela ne met pas en échec la théorie des catastrophes. Il n'est pas certain que le mode de culture continue que nous avons utilisé permette d'obtenir des minimums de potentiel pour les valeurs des variables que nous souhaitons. Même si cela est possible, les paramètres de la culture sont nombreux et leur exploration peut être très longue. Les cultures en fioles ou sur milieu gélosé nous ont montré l'importance de la densité cellulaire (que l'on contrôle en culture continue via  $S_0$ ) et de l'"anaérobiose" ; sous ce dernier terme se cachent plusieurs paramètres : pression partielle d' $O_2$ , concentration de  $HCO_3^-$  par exemple. Le microorganisme sera sensible en fait aux variables correspondantes dans le fermenteur, qui se placeront sur un équilibre qui dépend de la valeur des paramètres externes : débit des gaz, pH du milieu, température, mais aussi  $S_0$  qui contrôle la biomasse et par conséquent la demande d'oxygène et le rejet de  $CO_2$ . C'est le mérite de la théorie des catastrophes de pouvoir intégrer tous ces facteurs.

Il ne faut pas perdre complètement l'espoir d'obtenir un jour toutes les formes de *Candida albicans* en culture continue, mais il n'existe pas vraiment de méthode pour cela. Nous avons cependant la chance d'avoir obtenu, presque par hasard, la transformation levure  $\longleftrightarrow$  mycélium. C'est peut être l'étude de l'ensemble de catastrophes de cette transformation qui nous conduira à trouver dans l'espace des paramètres une région où la morphologie est "indéterminée", intermédiaire entre les 4 formes. A partir de cette région, nous pourrions peut-être trouver les valeurs des paramètres pour obtenir les autres formes.



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

*Candida albicans* présente quatre états morphologiques différents et le passage brutal d'un état à un autre s'observe facilement en culture. Des formes intermédiaires existent : on observe quelquefois des chaînes de levures plus ou moins allongées qui font une transition entre la levure et le pseudomycélium. Ces formes intermédiaires agacent l'expérimentateur habitué à la loi du "tout ou rien" : en effet ces états morphologiques semblent être du domaine qualitatif. Nous avons montré qu'il n'y a pas d'opposition entre qualitatif et quantitatif : grâce à la théorie des catastrophes et à la fronce on comprend aussi bien le passage brutal de l'état levure à l'état pseudomycélium que le passage progressif.

*Candida albicans* est un organisme propice aux études morphogénétiques : il est facile à cultiver, et il présente 4 formes différentes. Les corrélations qui semblent exister entre les formes levure et mycélium d'une part et les états saprophytique et parasitaire d'autre part, augmentent l'intérêt des études morphogénétiques de cette espèce.

Notre étude physiologique de la chlamydosporulation de *C. albicans* a permis de préciser les conditions initiales qui conduisent de manière stable à la production des chlamydo-spores ; nous avons aussi élucidé certaines

contradictions apparentes en particulier à propos du rôle de l'"anaérobiose" en montrant que les résultats sont différents selon la densité d'ensemencement. Les physiologistes connaissent bien cette interdépendance des facteurs ; la théorie des catastrophes en donne une description et procure ainsi le langage qui, bien souvent, nous fait défaut.

Il nous semble important d'insister une dernière fois sur la notion de stabilité, qui permet une grande reproductibilité du résultat malgré de petites perturbations des conditions initiales ou de la valeur des paramètres de l'expérience. Un certain nombre d'expériences ne sont reproductibles qu'à la condition d'une très grande précision des conditions initiales ou du moins de la valeur d'une variable initiale  $x_0$  ; une très faible variation de cette valeur,  $x_0 + \varepsilon$ , conduit à un résultat différent : il s'agit de conditions initiales instables ; on est obligé dans ce cas d'augmenter la précision de la mesure de  $x_0$  ; mais il serait possible également de se placer dans une région plus stable des conditions initiales en modifiant la valeur initiale d'une autre variable  $y_0$ .

L'utilisation du langage de la théorie des catastrophes pour la description des phénomènes morphogénétiques présente au moins deux avantages : ce langage nous libère de la langue habituelle et de ses imprécisions, et il permet de rapprocher des phénomènes très différents comme la machine de ZEEMAN et la morphogénèse de *Candida albicans*. Dans des domaines plus proches, les formations de frontières seront traitées de la même manière et c'est ainsi que nous avons été amené à créer des gradients (d'anaérobiose et de densité d'ensemencement) pour observer des déplacements et des stabilisations de frontière. "Il fallait être bon observateur pour décrire cet agrandissement de la zone avec chlamydozoaires qui ne mesure guère qu'une dizaine de millimètres". Nous pourrions accepter ce compliment, mais en fait si nous avons observé ce phénomène c'est parce que nous l'attendions et nous l'attendions parce que la théorie des catastrophes le prévoyait.

La technique de culture continue, en supprimant le paramètre temps, aurait pu nous rendre maître de la morphogénèse, mais surtout elle nous aurait permis de mettre en évidence, nous l'espérons, un phénomène d'hystérésis. Par variation d'un paramètre, nous n'aurions pas obtenu les morphogénèses inverses pour la même valeur du paramètre. Ceci est cependant possible

à vérifier dans la transformation levure  $\longleftrightarrow$  mycélium que nous savons réaliser en culture continue ; c'est un premier projet.

Nous pensons également poursuivre nos investigations en considérant comme système non plus le contenu de la fiole, non plus un thalle, mais une cellule ; voici quelques voies de réflexion :

Nous avons déjà fait remarquer que, dans les fioles de culture, les chlamydo-spores apparaissent de manière synchrone sur des thalles dont le développement n'est pas synchrone. Cela nous conduit à penser que le signal, la valeur seuil des paramètres, est extérieur aux thalles eux-mêmes. Cependant toutes les cellules des thalles ne produisent pas de chlamydo-spores ; ce sont presque exclusivement les cellules des extrémités des rameaux qui les produisent. Il semble que l'âge de la cellule intervienne. Dans cette notion d'âge il faut tenir compte, selon nous, du nombre de fois que la cellule a bourgeonné, et du stade atteint par cette cellule dans le cycle de division cellulaire en cours : on pense très souvent que dans une culture synchrone toutes les cellules sont dans le même état. Elles ne sont en fait qu'en phase ; une cellule de levure conserve très certainement le souvenir du nombre de fois qu'elle a bourgeonné : elle conserve des cicatrices de bourgeonnement, mais aussi un certain "embonpoint" ; JOHNSTON et Coll. (51) ont montré que le volume des levures de *Saccharomyces cerevisiae* augmente en fonction du nombre de cicatrices de bourgeonnement qu'elles portent. Pour obtenir des levures identiques on peut utiliser la technique décrite récemment par NAVARRO et DURAND (69) : des levures sont immobilisées sur un support à l'intérieur d'une colonne dans laquelle l'on fait passer le milieu nutritif. On observe que les levures bourgeonnent de manière synchrone et l'effluent ne contient que des cellules-filles.

Si la description de la morphogénèse est abordée à l'échelle de la cellule, elle se fera dans le cadre du cycle de division cellulaire. Celui de *Saccharomyces cerevisiae* a été très étudié (45, 57) et pourra servir de référence. Le cycle de division de cette levure comporte un certain nombre de catastrophes qui s'articulent entre elles. Ce problème de l'articulation des catastrophes est posé par THOM (112, page 122) ; on pourrait trouver dans le cycle de division cellulaire une partie du matériel expérimental dont on a besoin pour chercher à le résoudre.

La notion de cycle évoque celle d'oscillateur et certaines recherches théoriques (35, 36, 37) traitent la cellule comme un oscillateur. En fait, il vaudrait mieux envisager, chez les levures comme *S. cerevisiae*, deux oscillateurs : l'un concernant le noyau, l'autre le cytoplasme. Ces deux oscillateurs sont généralement en résonance aiguë : une première catastrophe appelée "start" semble contrôler les catastrophes suivantes : initiation de la synthèse d'ADN, évènements mitotiques en ce qui concerne le noyau ou émergence du bourgeon, cytokinèse en ce qui concerne le cytoplasme. Le délai à partir du "start" pour chacune des autres catastrophes est constant à une même température ; ce délai ne dépend pas de la durée totale du cycle qui est fonction du temps passé par la cellule pour atteindre le "start" (14, 48) et qui varie selon les milieux de culture et la taille initiale de la cellule. Certains (116) pensent que le "start" correspondrait au franchissement d'un seuil de concentration intracellulaire des ARN de transfert de la méthionine.

Nous pensons cependant que dans le mycélium de *Candida albicans* dont les articles sont plurinucléés, les oscillateurs nucléaire et cytoplasmique sont en résonance floue : le rapport des périodes des deux oscillateurs n'est sans doute pas simple (ne peut pas être mis sous la forme d'une fraction dont le numérateur et le dénominateur sont des petits nombres). Cette question de la modélisation des oscillateurs et de leur résonance à l'aide de la théorie des catastrophes a été abordée par THOM (112) et par ZEEMAN (130, 133, 134, 135) et ces travaux pourraient servir de point de départ : le cycle de division cellulaire avec ses deux oscillateurs pourrait être figuré par une trajectoire attractante fermée tracée sur un tore (cf. THOM, 112, pages 186-192). Il pourrait exister plusieurs trajectoires attractantes (imaginons des sillons qui ne communiquent pas entre eux séparés par des crêtes) correspondant aux différentes morphologies. La composition du milieu de culture et les autres paramètres externes (température,....) modifieraient la profondeur relative de ces sillons, feraient s'effacer les crêtes et amèneraient les changements de morphologie.

Remarquons enfin que le système constitué par une cellule se détruit au moment de la cytokinèse et réapparaît sous forme de deux nouveaux systèmes : la cellule-mère et la cellule-fille. Ces deux cellules ne sont

jamais tout à fait identiques (phénomène de divergence), on peut imaginer qu'il y a un peu avant "start" un attracteur qui permet aux cellules de repartir sur la même trajectoire. Un tel point attracteur a été mis en évidence dans le cycle de division cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* (116) ; les cellules s'y accumulent lorsque le milieu est épuisé. Ce point serait l'analogue du point d'équilibre décrit pour la fibre nerveuse par ZEEMAN (130).

Nous terminerons sur cette réflexion qui montre bien les possibilités d'analyse et de synthèse de la théorie des catastrophes.



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

Les références sont classées selon l'ordre alphabétique de l'ensemble des auteurs.

1. ANDRIEU S., J. BIGUET, R. JACQUES, B. DEHORTER et L. LACOSTE, 1977. - Photoinhibition de la chlamydosporulation de *Candida albicans*. *Sabouraudia* 15 : 207-214.
2. ANDRIEU S., L. DUJARDIN et L. LACOSTE, 1975. - Action de la lumière sur la chlamydosporulation de *Candida albicans*. *Bull. Soc. Mycol. Med.* 4 : 103-106.
3. ANDRIEU S. et M. THERIZOL, 1974. - Diagnostic biologique des candidoses. Editions Maffioti, Paris.
4. ASCHNER M., 1958. - A simple medium for demonstration of chlamydospores in *Candida albicans*. *Bull. Res. Coun. Israel, sect. E7* : 1-2.
5. BAKERSPIGEL A., 1954. - Soil extract agar for *Candida albicans*. *Arch. Derm. Syph.* 69 : 735-737.
6. BAKERSPIGEL A., 1962. - Sodium taurocholate medium for the identification of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 83 : 694.
7. BASTIDE J.M., E.H. HADIBI et M. BASTIDE, 1979. - Taxonomic significance of yeast sphaeroplast release after enzymatic treatment of intact cells. *J. Gen. Microbiol.* 113 : 147-153.

8. BASTIDE J.M., D. SCHEIBER, E. HADIBI, S. JOUVERT et M. BASTIDE, 1979. - The cell-wall enzymolysis test : taxonomic study of genera *Candida* and *Torulopsis*. *Adv. in Protoplasts Res., Proc. Vth Internat. Protoplast Symp., Szeged* : 221-227.
9. BEDELL G.W., A. WERTH et D.R. SOLL, 1980. - The regulation of nuclear migration and division during synchronous bud formation in released stationary phase cultures of the yeast *Candida albicans*. *Exp. Cell. Res.* 127 : 103-113.
10. BENHAM R.W., 1931. - Certain monilias parasitic on man. Their identification by morphology and by agglutination. *J. infect. Dis.* 49 : 183-215.
11. BORELLI D., 1971. - Candidiosis genital femenina : Identificacion de *Candida albicans* en cultivo naciente. *Dermat. Iberolatino-am.* 13 : 333-337.
12. BUCKLEY H.R. et N. VAN UDEN, 1962. - The identification of *Candida albicans* within two hours by the use of an egg white preparation. *Sabouraudia* 2 : 205-208.
13. CARTER B.L.A. et M.N. JAGADISH, 1978. - The relationship between cell size and cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell. Res.* 112 : 15-24.
14. CARTER B.L.A. et A. LORINCZ, 1978. - Protein synthesis, cell division and the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae* following a shift to a richer medium. *J. Gen. Microbiol.* 106 : 222-225.
15. CASAL M. et M.J. LINARES, 1981. - The comparison of six media for chlamydospore production by *Candida albicans*. *Mycopathologia* 76 : 125-128.
16. DAWES I.W. et J. MANDELSTAM, 1970. - Sporulation of *Bacillus subtilis* in continuous culture. *J. Bacteriol.* 103 : 529-535.
17. DAWSON C.O., 1962. - Identification of *Candida albicans* in primary culture. *Sabouraudia* 1 : 214-219.
18. DUJARDIN L. et S. WALBAUM, 1977. - Influence de la concentration en glucose et de la densité d'ensemencement sur la production des chlamydospores de *Candida albicans* ; étude quantitative. *Bull. Soc. Mycol. Med.* 6 : 39-44.
19. DUJARDIN L. et S. WALBAUM, 1977. - Influence des facteurs nutritifs (glucose, azote, biotine) sur la production des chlamydospores de *Candida albicans* en milieu synthétique. *Bull. Soc. Mycol. Med.* 6 : 177-183.
20. DUJARDIN L. et S. WALBAUM, 1978. - N-acétyl-D-glucosamine et chlamydospores de *Candida albicans*. *Bull. Soc. Mycol. Med.* 7 : 25-28.
21. DUJARDIN L. et S. WALBAUM, 1979. - Influence de l'épaisseur du milieu de culture et de la densité d'ensemencement sur la production des chlamydospores de *Candida albicans* cultivé sur Riz-Agar-Tween. *Bull. Soc. Mycol. Med.* 8 : 5-9.



22. DUJARDIN L. et S. WALBAUM, 1980. - Chlamydosporulation de *Candida albicans* : avec ou sans lamelle. *Bull. Soc. Mycol. Med.* 9 : 31-34.
23. DUJARDIN L. et S. WALBAUM, 1980. - Variations quantitatives des paramètres externes et morphologie de *Candida albicans* en culture continue. *Bull. Soc. Mycol. Med.* 9 : 189-192.
24. DUJARDIN L. et S. WALBAUM, 1981. - Vague de chlamydosporulation de *Candida albicans* sur différents gradients. *Bull. Soc. Mycol. Med.* 10 : 53-56.
25. DUJARDIN L., S. WALBAUM et J. BIGUET, 1978. - La chlamydosporulation de *Candida albicans* : influence de la densité d'ensemencement et de la concentration de glucose, d'azote, de biotine et de sels minéraux dans une décoction de crème de riz. *Ann. Microbiol.* 129B : 183-193.
26. DUJARDIN L., S. WALBAUM et J. BIGUET, 1980. - Influence de la concentration du glucose et de l'azote sur la morphologie de *Candida albicans* et la formation de ses chlamydo-spores dans un milieu de culture synthétique. *Mycopathologia* 71 : 113-118.
27. DUJARDIN L., S. WALBAUM et J. BIGUET, 1980. - Chlamydosporulation de *Candida albicans* : déroulement de la morphogénèse ; influence de la lumière et de la densité d'ensemencement. *Ann. Microbiol.* 131A : 141-149.
28. DUNCAN J. et J. FLOEDER, 1963. - A comparison of media for the production of chlamydo-spores by *Candida albicans*. *Am. J. Medical Technol.* 29 : 199-206.
29. DUTT-CHOUDHURI R. et R. DUTT, 1961. - A simple medium for the demonstration of chlamydo-spores of *Candida albicans*. *Nature* 189 : 418.
30. EKELAND I., 1977. - La théorie des catastrophes. *La Recherche* 8 : 745-754.
31. FEO M., 1974. - Estudio de las condiciones de formación de las clamidosporas. *Rev. lat-amer. Microbiol.* 16 : 105-110.
32. FEO M. et A. DE PACHECO, 1976. - La leche en la producción de clamidosporas. *Rev. lat-amer. Microbiol.* 18 : 23-24.
33. FERRERO I., C. ROSSI, N. MARMIROLI, C. DONNINI et P.P. PUGLISI, 1981. - Effect of chloramphenicol, antimycin A and hydroxamate on the morphogenetic development of the dimorphic ascomycete *Endomycopsis capsularis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 47 : 311-323.
34. FLEMING W.H., J.M. HOPKINS et G.A. LAND, 1977. - New culture medium for the presumptive identification of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 5 : 236-243.
35. GILBERT D.A., 1978. - The mechanism of action and interaction of regulators of cell replication. *Biosystems* 10 : 227-233.
36. GILBERT D.A., 1978. - The relationship between the transition probability and oscillator concepts of the cell cycle and the nature of the commitment to replication. *Bio Systems* 10 : 235-240.

37. GILBERT D.A., 1978. - Feedback quenching as a means of effectively increasing the period of biochemical and biological oscillators. *Bio Systems* 10 : 241-245.
38. GONDO S., K. KAUSHIK et K. VENKATASUBRAMANIAN, 1978. - Two (carbon)-substrate continuous cultures : multiple steady states and their stability. *Biotechnol. Bioeng.* 20 : 1479-1485.
39. GORDON M.A., E.G. BRADLEY et V.Q. GRANT, 1952. - The influence of different types of corn meal agar upon chlamydospore production by *Candida albicans*. *J. Lab. Clin. Med.* 40 : 316-320.
40. GORDON M.A. et G.N. LITTLE, 1963. - Effective deshydrated media with surfactants for identification of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 2 : 171-175.
41. GRIFFITHS D.A., 1974. - The origin, structure and fonction of chlamydospores in fungi. *Nova Hedwigia* 25 : 503-547.
42. GUERIN B. et R. JACQUES, 1968. - Photoinhibition de l'adaptation respiratoire chez *Saccharomyces cerevisiae*. II. Le spectre d'action. *Biochimica et Biophysica Acta* 153 : 138-142.
43. GUNASEKARAN M. et W.F. HUGHES, 1977. - A simple medium for isolation of *Candida albicans* directly from clinical specimens. *Mycopathologia* 61 : 151-157.
44. GUNASEKARAN M. et W.F. HUGUES, 1978. - A simple liquid medium for chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 64 : 143-146.
45. HARTWELL L.H., 1974. - *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev.* 38 : 164-198.
46. HAYES A., 1966. - Chlamydospore production in *Candida albicans*. *Mycopath. Mycol. appl.* 29 : 87-96.
47. HINZELIN F. et P. LECTARD, 1979. - Les levures dans les stations d'épuration des eaux usées. *Mycopathologia* 69 : 121-127.
48. JAGADISH M.N. et B.L.A. CARTER, 1978. - Effects of temperature and nutritional conditions on the mitotic cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* 31 : 71-78.
49. JANSONS V.K. et W.J. NICKERSON, 1970. - Induction, morphogenesis and germination of the chlamydospore of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 104 : 910-921.
50. JEREBZOFF-QUINTIN S., S. JEREBZOFF et R. JACQUES, 1975. - Caroténogénèse et rythme endogène de sporulation chez le *Leptosphaeria michotii* (West.) Sacch. I. Action d'éclaircissements monochromatiques, de la diphénylamine, de l'antimycine A sur l'évolution de la caroténogénèse. *Physiol. Vég.* 13 : 55-67.

51. JOHNSTON G.C., C.W. EHRHARDT, A. LORINCZ et B.L.A. CARTER, 1979. - Regulation of cell size in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 137 : 1-5.
52. JUMARIE G., 1980. - Subjectivité, information, système ; synthèse pour une cybernétique relativiste. Editions Univers Inc., Montréal.
53. KAPICA L., A. CLIFFORD et M. NOIK, 1969. - Room temperature incubation for chlamydospore production by *Candida albicans*. *Mycopath. Mycol. appl.* 37 : 338-344.
54. KLIGMAN A.M., 1950. - Aids in technic in identification of *Candida albicans*. *J. Invest. Derm.* 14 : 173-176.
55. KOT E.J., V.L. OLSON, L.J. ROLEWIC et D.O. MAC CLARY, 1976. - An alternate respiratory pathway in *Candida albicans*. *Antonie van Leeuwenhoek* 42 : 33-48.
56. LACOSTE L., 1965. - Biologie naturelle et culturale du genre *Leptosphaeria* Cesati et de Notaris. Déterminisme de la reproduction sexuelle. Thèse de Doctorat ès-Sciences, Toulouse.
57. LLOYD D., R.K. POOLE et S.W. EDWARDS, 1982. - Cell division cycle. Temporal organization and control of cellular growth and reproduction. Academic Press, London.
58. LODDER J., 1970. - The yeasts ; a taxonomic study. North-Holland publishing Company, Amsterdam-Londres.
59. LODDER J. et N.J.W. KREGER VAN-RIJ, 1952. - The yeasts; a taxonomic study. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
60. LORD G.P. et A.E. WHEALS, 1980. - Asymmetrical division of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 142 : 808-818.
61. LOURIA D.B., J.K. SMITH, R.G. BRAYTON et M. BUSE, 1972. - Anti-*Candida* factors in serum and their inhibitors. I. Clinical and laboratory observations. *J. Infect. Dis.* 125 : 102-114.
62. MAC CLARY D.O., 1952. - Factors affecting the morphology of *Candida albicans*. *Ann. Missouri Botanical garden* 39 : 137-164.
63. MACKENZIE D.W.R., 1962. - Serum tube identification of *Candida albicans*. *J. Clin. Pathol.* 15 : 563-565.
64. MACKENZIE D.W.R., 1964. - Morphogenesis of *Candida albicans in vivo*. *Sabouraudia* 3 : 225-232.
65. MANNING M. et T.G. MITCHELL, 1980. - Strain variation and morphogenesis of yeast- and mycelial-phase *Candida albicans* in low-sulfate, synthetic medium. *J. Bacteriol.* 142 : 714-719.
66. MEINHOF W., P. LASCHKA et C. SCHERWITZ, 1975. - Ein vollsynthetisches Medium für die rasche Chlamydosporenbildung von *Candida albicans*. *Mykosen* 18 : 291-298.

67. MILLER S.E., J.R. SCHELD et G.E. MICHAELS, 1975. - Development and germination of *Candida albicans* chlamydospore in relation to age. *J. gen. appl. Microbiol.* 21 : 273-278.
68. MONOD J., 1950. - La technique de culture continue. Théorie et applications. *Ann. Inst. Pasteur* 79 : 390-410.
69. NAVARRO J.M. et G. DURAND, 1981. - Synchronisation de la croissance de microorganismes immobilisés sur des supports solides. *Ann. Microbiol.* 132B : 241-255.
70. NG A.M.L., J.E. SMITH et A.F. Mc INTOSH, 1973. - Conidiation of *Aspergillus niger* in continuous culture. *Arch. Microbiol.* 88 : 119-126.
71. NICKERSON W.J. et Z. MANKOWSKI, 1953. - A polysaccharide medium of known composition favouring chlamydospore formation in *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 92 : 20-25.
72. NICKERSON W.J. et Z. MANKOWSKI, 1953. - Role of nutrition in the maintenance of the yeast shape in *Candida*. *Am. J. Bot.* 40 : 584-592.
73. ODDS F.C., 1979. - *Candida* and Candidosis. Leicester University Press.
74. OLAIYA A.F. et S.J. SOGIN, 1979. - Ploidy determination of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 140 : 1043-1049.
75. PACKER N.H. et A.M. BERSTEN, 1978. - A continuous culture method for obtaining 100 % triangular cells of *Trigonopsis variabilis*. *J. Gen. Microbiol.* 107 : 377-379.
76. PAVLATOU M. et U. MARCELOU, 1956. - Milieu favorisant la formation des chlamydospores de *Candida albicans*. *Ann. Inst. Pasteur* 91 : 410-413.
77. PAVLATOU M. et U. MARCELOU, 1957. - Sur le rôle de la bile dans le milieu PCB. Autres substances qui fournissent la production de chlamydospores par *Candida albicans*. *Ann. Inst. Pasteur* 93 : 146-149.
78. PAZNOKAS J.L. et P.S. SYPHERD, 1975. - Respiratory capacity, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and morphogenesis of *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.* 124 : 134-139.
79. PILAT P., J. VORTRUBA, P. DOBERSKY et A. PROKOP, 1976. - Application of mathematical optimization methods in microbiology. *Folia microbiol.* 21 : 391-405.
80. POLLAK J.D. et R.W. BENHAM, 1957. - The chlamydospores of *Candida albicans* : comparison of three media for their induction. *J. Lab. Clin. Med.* 50 : 313-317.
81. POSTON T. et I. STEWART, 1978. - Catastrophe theory and its applications. Pittman, Londres.
82. POULTER R., K. JEFFERY, M.J. HUBBARD, M.G. SHEPHERD et P.A. SULLIVAN, 1981. - Parasexual genetic analysis of *Candida albicans* by spheroplast fusion. *J. Bacteriol.* 146 : 833-840.

83. RAJASINGHAM K.C. et R.A. CAWSON, 1980. - Ultrastructural organisation of the invasive hypha of *Candida albicans*. *Microbios Letters* 14 : 65-69.
84. RAUDONIS B.M. et A.G. SMITH, 1982. - Germination of the chlamydospores of *Candida albicans*. *Mycopathologia* 78 : 87-91.
85. REID D.J., M.M. JONES et E.B. CARTER, 1953. - A simple clear medium for demonstration of chlamydospores of *Candida albicans*. *Am. J. Clin. Path.* 23 : 938-941.
86. REISS F. et G. SZILAGYI, 1965. - Chlamydospore formation of *Candida albicans*; Comparative studies on special media. *Dermatologica* 131 : 315-324.
87. ROBINSON P.M. et J.M. SMITH, 1979. - Development of cells and hyphae of *Geotrichum candidum* in chemostat and batch culture. *Trans. Br. Mycol.* 72 : 39-47.
88. RUSSELL R.M. et R.D. TANNER, 1978. - Multiple steady state in continuous fermentation processes with bimodal growth kinetics. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* 17 : 157-161.
89. SAEZ H. et S. ANDRIEU, 1979. - Etude mycologique comparée de *Candida stellatoidea* et *C. albicans*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 54 : 555-566.
90. SALTARELLI C.G. et C.P. COPPOLA, 1979. - Effect of light on growth and metabolite synthesis in *Candida albicans*. *Mycologia* 71 : 773-785.
91. SARACHEK A., D.D. RHOADS et R.H. SCHWARZHOFF, 1981. - Hybridization of *Candida albicans* through fusion of protoplasts. *Arch. Microbiol.* 129 : 1-8.
92. SCHULZ B.E., G. KRAEPELIN et W. HINKELMANN, 1974. - Factors affecting dimorphism in *Mycotypha* (Mucorales) : a correlation with the fermentation/respiration equilibrium. *J. Gen. Microbiol.* 82 : 1-13.
93. SEGAL E. et E. EYLAN, 1974. - Nucleic acid homologies between *Candida albicans* and *Hansenula* species. *Microbios* 10 : 133-138.
94. SEGAL E. et E. EYLAN, 1975. - Nucleic acid homology studies among *Candida albicans* and *Leucosporidium* species. *Microbios* 12 : 111-117.
95. SEGAL E. et E. EYLAN, 1978. - Nucleic acid homologies between *Candida albicans* and *Kluyveromyces* species. *Microbios letters* 5 : 23-27.
96. SHEPHERD M.G., C.M. CHIN et P.A. SULLIVAN, 1978. - The alternate respiratory pathway of *Candida albicans*. *Arch. Microbiol.* 116 : 61-67.
97. SHEPHERD M.G. et P.A. SULLIVAN, 1976. - The production and growth characteristics of yeast and mycelial forms of *Candida albicans* in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 93 : 361-370.
98. SHEPHERD M.G., C.Y. YIN, S.P. RAM et P.A. SULLIVAN, 1980. - Germ tube induction in *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.* 26 : 21-26.

99. SIMCHEN G., R. PINON et Y. SALTS, 1972. - Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* : premeiotic DNA synthesis, readiness, and commitment. *Exp. Cell. Res.* 75 : 207-218.
100. SIMON K., 1958. - Synthetische Nährböden für anaskosporogene Hefen. *Naturwissenschaften* 45 : 21-22.
101. SIMONETTI N., V. STRIPPOLI et A. CASSONE, 1974. - Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature* 250 : 344-346.
102. SMITH J.K. et D.B. LOURIA, 1972. - Anti-*Candida* factors in serum and their inhibitors. II. Identification of a *Candida*-clumping factor and the influence of the immune response on the morphology of *Candida* and on Anti-*Candida* activity of serum in rabbits. *J. Infect. Dis.* 125 : 115-122.
103. SOLL D.R., G. BEDELL, J. THIEL et M. BRUMMEL, 1981. - The dependency of nuclear division on volume in the dimorphic yeast *Candida albicans*. *Exp. Cell. Res.* 133 : 55-62.
104. STENDERUP A. et A. LETH BAK, 1968. - Deoxyribonucleic acid base composition of some species within the genus *Candida*. *J. Gen. Microbiol.* 52 : 231-236.
105. STEWART I., 1982. - Oh ! Catastrophe. *Librairie Belin, Paris*.
106. STREIBLOVA E. et K. BERAN, 1963. - Demonstration of yeast scars by fluorescence microscopy. *Exp. Cell. Res.* 30 : 603-605.
107. STRIPPOLI V. et N. SIMONETTI, 1975. - Specific induction of chlamydospore formation in *Candida albicans* by N-acetyl-D-glucosamine. *Experientia* 31 : 130-131.
108. SUKROONGREUNG S., 1971. - Glutinous rice culture medium for demonstration of chlamydospores of *Candida albicans*. *Mycopath. Mycol. appl.* 43 : 329-335.
109. TASCHDJIAN C.L., 1953. - A simply prepared identification medium for *Candida albicans*. *Mycologia* 45 : 474-475.
110. TASCHDJIAN C.L., 1957. - Routine identification of *Candida albicans* : current methods and a new medium. *Mycologia* 49 : 332-338.
111. TASCHDJIAN C.L., J.J. BURCHALL et P.J. KOZINN, 1960. - Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. *Am. J. Dis. Child.* 99 : 212-215.
112. THOM R., 1980. - Modèles mathématiques de la morphogénèse. *Christian BOURGEOIS éditeur, Paris*.
113. THOMPSON P.W. et A.E. WHEALS, 1980. - Asymmetrical division of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose limited culture. *J. Gen. Microbiol.* 121 : 401-409.

114. TRITSMAN E. et J. VERSTRAETE, 1958. - Facteurs favorisant la formation de chlamydo-spores chez *Candida albicans* sur milieu de Nickerson-Mankowski. *C.R. Soc. biol.* 151 : 1635-1637.
115. TYSON C.B., P.G. LORD et A.E. WHEALS, 1979. - Dependency of size of *Saccharomyces cerevisiae* cells on growth rate. *J. Bacteriol.* 138 : 92-98.
116. UNGER M.W. et L.H. HARTWELL, 1976. - Control of cell division in *Saccharomyces cerevisiae* by methionyl-tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73 : 1664-1668.
117. VANBREUSEGHEM R., C. DE VROEY et M. TAKASHIO, 1978. - Guide pratique de mycologie médicale et vétérinaire. Masson, Paris.
118. VAN DER WALT J.P., 1970. - The genus *Syringospora* Quinquad Emend. *Mycopath. Mycol. appl.* 40 : 231-243.
119. WALBAUM S. et L. DUJARDIN, 1981. - Production de tubes germinatifs par les jeunes chlamydo-spores de *Candida albicans*. *Bull. Soc. Mycol. Med.* 10 : 175-178.
120. WALKER L. et M. HUPPERT, 1960. - Corn meal tween agar : an improved medium for the identification of *Candida albicans*. *Amer. J. Clin. Pathol.* 33 : 190-194.
121. WHELAN W.L. et P.T. MAGEE, 1981. - Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 145 : 896-903.
122. WHELAN W.L., R.M. PARTRIDGE et P.T. MAGEE, 1980. - Heterozygosity and segregation in *Candida albicans*. *Molec. gen. Genet.* 180 : 107-113.
123. WINTER W.D. et G.E. FOLEY, 1955. - Failure of *Candida stellatoidea* to qualify as a species. *J. Infect. Dis.* 97 : 227-230.
124. WOLIN H.L., M.L. BEVIS et N. LAURORA, 1962. - An improved synthetic medium for the rapid production of chlamydo-spores by *Candida albicans*. *Sabouraudia* 2 : 96-99.
125. YAGI T., 1977. - Control of yeast mycelial dimorphism in *Endomycopsis fibuligera*. *Trans. mycol. Soc. Japan* 18 : 357-364.
126. YAMAGUCHI H., 1974. - Mycelial development and chemical alteration of *Candida albicans* from biotin insufficiency. *Sabouraudia* 12 : 320-328.
127. YANO T. et T. MIZOBUCHI, 1980. - A generalized model and optimum conditions for the steady operation of a chemostat subject to substrate inhibition. *J. ferment. technol.* 58 : 47-52.
128. YONG D.C.T., C. SMITKA, A. PRYTULA et J. KANE, 1978. - The comparison of two agar media for germ tube and chlamydo-spore production by *Candida albicans*. *Health. Lab. Sci.* 15 : 197-200.
129. ZALKINDER V., 1979. - Correlation between cell nutrition, cell size and division control. *Biosystems* 11 : 295-322.

130. ZEEMAN E.C., 1972. - Differential equations for the heart beat and nerve impulse. In : "Towards a theoretical biology" (C.H. WADDINGTON, ed.) Edimburg University Press, Edinburg 4 : 8-67.
131. ZEEMAN E.C., 1972. - A catastrophe machine. In : "Towards a theoretical biology" (C.H. WADDINGTON, ed.) Edimburg University Press, Edinburg 4 : 276-282.
132. ZEEMAN E.C., 1974. - Primary and secondary waves in developmental biology. Lectures on mathematics in the life sciences. *American Mathematical Society, Rhode Island* 7 : 69-161.
133. ZEEMAN E.C., 1976. - Duffing's equation in brain modelling. *Bull. Inst. Math. and Appl.* 12 : 207-214.
134. ZEEMAN E.C., 1976. - Catastrophe theory. *Sci. Amer.* 234 : 65-83.
135. ZEEMAN E.C., 1977. - Catastrophe theory. Addison-Wesley Publishing Company, Inc., London.
136. ZEEMAN E.C. et D.J.A. TROTMAN, 1976. - Classification of elementary catastrophes of codimension  $\leq 5$ . *Lecture notes in Mathematics* 525 : 263-327.
137. ZORGOPULOS J., A.J. JOBBAGY et H.F. TERENZI, 1973. - Effects of ethylenediaminetetraacetate and chloramphenicol on mitochondrial activity and morphogenesis in *Mucor rouxii*. *J. Bacteriol.* 115 : 1198-1204.





## R E S U M E

Le Champignon *Candida albicans* présente 4 aspects morphologiques : levure, pseudomycélium, mycélium et chlamyospore. Une étude physiologique classique nous a permis de préciser les facteurs qui déterminent la production des chlamyospores : densité d'ensemencement, composition et pH du milieu de culture, conditions d'aérobiose et d'éclairement. Il est important de noter l'interdépendance de ces facteurs : les concentrations de glucose favorables sont différentes selon le pH du milieu par exemple. L'étude du déroulement de la morphogénèse montre aussi que les chlamyospores apparaissent brutalement après une durée variable selon les conditions de culture.

On peut considérer le résultat de ce type d'étude comme un catalogue de recettes. Afin de mettre de l'ordre dans ce catalogue, de le rendre intelligible, nous proposons d'interpréter ces faits à l'aide de la Théorie des Catastrophes.

En effet, cette théorie permet de décrire des phénomènes dans lesquels des variations continues de certains paramètres (externes) produisent une variation brutale des variables (internes). Elle fait appel à une dynamique de gradient : les variables se placent sur un minimum (local ou absolu) d'une fonction (potentiel) dont la forme dépend de la valeur des paramètres. Si le nombre des variables est  $\leq 2$  et celui des paramètres  $\leq 4$ , la situation locale la plus compliquée que l'on puisse rencontrer est décrite par l'une des 7 catastrophes élémentaires (selon le résultat fondamental de THOM).

L'utilisation de cette théorie permet de décrire l'évolution morphologique des cultures de *Candida albicans*. Par exemple l'évolution d'un thalle peut se décrire en fonction de sa localisation dans un gradient : gradient de densité d'ensemencement, d'"anaérobiose", ou de pH. Dans tous les cas on observe une frontière qui sépare une zone avec et une zone sans chlamyospores. Cette frontière se déplace et se stabilise conformément aux prévisions de la théorie. L'évolution du contenu d'une fiole de culture est décrite à l'intérieur d'un cratère de potentiel. Lorsque l'on ensemence la fiole, on place les variables sur le cratère, à une certaine valeur de potentiel qui évoluera vers un minimum. La théorie des catastrophes permet donc de comprendre comment à partir de certaines conditions de culture on obtient un certain type de développement.

## M O T S - C L E F S

- CANDIDA ALBICANS. MORPHOGENESE / CATASTROPHES (THEORIE DES)
- CATASTROPHES (THEORIE DES) / CANDIDA ALBICANS. MORPHOGENESE