

N° d'ordre : 357

50376
1984
285

50376
1984
285

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

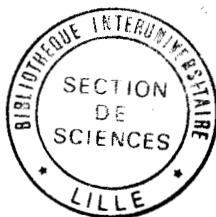
DOCTEUR - INGÉNIEUR

(mention : Biochimie appliquée)

par

Jean - Pierre REMY

**METABOLISME INTERMEDIAIRE
D'ASPERGILLUS ORYZAE (ALHB.) COHN. :
ETUDE DE SA REGULATION ET DE SES RAPPORTS
AVEC LA PRODUCTION D' α -AMYLASE.**



Soutenu le	octobre 1984	devant la Commission d'Examen
L.	LACOSTE	Président
J.P.	SCHWITZGUEBEL	Rapporteur
G.	GOMA	Examineur
A.	VERBERT	Examineur
R.	DELECOURT	Examineur

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

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Cryptogamie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, avec le concours de la Société Gist Brocades (ex.Rapidase).

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

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur SCHWITZGUEBEL de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, pour la bienveillance avec laquelle il a bien voulu examiner ce mémoire. L'aide qu'il m'a apportée pendant la rédaction de mon texte m'a été particulièrement précieuse.

Il m'est agréable de retrouver dans ce jury Monsieur le Professeur GOMA de l'I.N.S.A. de Toulouse, dont j'ai eu l'occasion d'apprécier lors de mon séjour à Toulouse, la grande compétence et la parfaite amabilité.

Je voudrais manifester ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur VERBERT, de m'avoir fait l'honneur d'être de ce jury.

Monsieur le Professeur ALBAGNAC, Directeur de l'I.N.R.A. de Villeneuve d'Ascq, m'a toujours reçu avec sollicitude et a mis à ma disposition les moyens de son laboratoire, notamment pour le dosage des acides organiques. Je tiens à l'assurer de ma respectueuse reconnaissance.

Je remercie également Monsieur DELECOURT, Directeur Scientifique de la Société Gist Brocades, pour l'aide matérielle qu'il a bien voulu m'accorder au long de ce travail.

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

S O M M A I R E

INTRODUCTION	1
CHAPITRE PRELIMINAIRE	
INTRODUCTION	3
I. CARACTERES GENERAUX D' <i>ASPERGILLUS ORYZAE</i>	4
1) Applications industrielles	4
2) Position systématique	5
3) Variabilité	6
4) Physiologie de la biosynthèse de l' α -amylase	7
A. <i>influence des constituants du milieu de culture</i> <i>sur la biosynthèse de l'α-amylase</i>	7
B. <i>mécanismes régulateurs de la biosynthèse</i>	9
II. CARACTERES PARTICULIERS AUX SOUCHES BrBv IV ET 1135	10
1) Caractères morphologiques des souches BrBv IV et 1135	10
2) Caractéristiques culturales des souches BrBv IV et 1135	10
A. <i>influence du maltose sur la synthèse de l'α-amylase</i> <i>chez les souches BrBv IV et 1135</i>	11
B. <i>influence du glucose sur la synthèse de l'α-amylase</i> <i>chez les souches BrBv IV et 1135</i>	11
III. PLAN DU TRAVAIL	15

CHAPITRE I. PHYSIOLOGIE DE L'ACCUMULATION DES ACIDES ORGANIQUES DANS LES MILIEUX DE CULTURE

INTRODUCTION	17
I. PRODUCTION DE L' α -AMYLASE SUR MILIEU DEPREZ MODIFIE	20
II. IDENTIFICATION DES COMPOSES ACIDES PRESENTS DANS LES FILTRATS DE CULTURE	21
1) Recherche de l'acide kojique dans les filtrats de culture	21
2) Identification des composés acides présents dans les filtrats de culture par chromatographie couche mince	22
3) Dosage enzymatique de l'acide glutamique et l'acide malique	24
4) Identification des acides organiques présents dans les filtrats de culture par chromatographie liquide haute pression	24
III. INFLUENCE DU GLUCOSE SUR L'ACCUMULATION DES ACIDES ORGANIQUES	33
1) Dosage du glucose dans les milieux de culture résultant d'une hydrolyse enzymatique du substrat	33
2) Recherche d'un "effet glucose" responsable de l'accumulation de l'acide malique	34
IV. INFLUENCE DE L'ACETATE DE SODIUM SUR LA PHYSIOLOGIE DE LA BIOSYNTHESE DE L' α -AMYLASE	36
1) Influence de l'acétate de sodium comme seule source de carbone	36
2) Influence du maltose supplémenté d'acétate de sodium	37
V. INFLUENCE D'UNE SOURCE D'AZOTE MINERALE SUR L'ACCUMULATION DES ACIDES ORGANIQUES DANS LES FILTRATS DE CULTURE	40
VI. CONCLUSION	42

CHAPITRE II. CARACTERISATION DES VOIES METABOLIQUES RESPONSABLES DE L'ACCUMULATION DES ACIDES ORGANIQUES

INTRODUCTION	45
I. ACTIVITE GLYCOLYTIQUE	50
II. ACTIVITE DU CYCLE DE KREBS ET DU CYCLE GLYOXYLIQUE	51
1) Activités isocitrate déshydrogénase NADP^+ , NAD^+ dépendante et isocitratase	51
a) purification et étude des constantes de l'isocitrate déshydrogénase NAD^+ et NADP^+ dépendante	55

b) purification et étude des constantes de <i>l'isocitratase</i>	58
c) étude de la régulation du rapport isocitrate <i>déshydrogénase isocitratase</i>	58
2) Activité malate synthétase	61
3) Activité succino-déshydrogénase	64
4) Activité malate-déshydrogénase	66
5) Activité α -cétoglutarate déshydrogénase	68
6) Activité glutamate déshydrogénase	69
7) Activité malique enzyme	72
 III. ETUDE DES ACTIVITES RESPIRATOIRES	 75
1) Activité NADH oxydase et NADH cytochrome c oxydoréductase ...	75
2) Etude de la respiration des souches BrBv IV et 1135	79
3) Recherche d'une fermentation éthanolique	82
4) Influence de l'aération des milieux de culture sur l'accumulation des acides organiques et sur la production d' α -amylase	83
 IV. CONCLUSION	 88

CHAPITRE III. ETUDE DES RAPPORTS LIANT L'ACCUMULATION DES
ACIDES ORGANIQUES ET LA SYNTHÈSE DE L' α -AMYLASE
SUR DES PROTOPLASTES DES SOUCHES BRBV IV ET 1135

INTRODUCTION	91
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	92
1) Le mycélium	92
2) Les enzymes lytiques	93
3) La solution stabilisatrice	94
II. ISOLEMENT DES PROTOPLASTES	95
1) Préparation du complexe lytique	95
2) Solution stabilisatrice	98
A. <i>pH de la solution</i>	98
B. <i>pression osmotique</i>	98
3) Le mycélium	100
A. <i>âge du mycélium employé</i>	100
B. <i>composition du milieu de culture</i>	100

4) Morphologie des protoplastes formés	103
5) Contrôle physiologique des protoplastes isolés	104
A. mesure des coefficients respiratoires	104
B. étude de la glucose-6-P déshydrogénase, de la malate déshydrogénase et de la NADH cytochrome c oxydoréductase	104
C. régénération des protoplastes	105
III. ETUDE DE LA PHYSIOLOGIE DE PRODUCTION DE L' α -AMYLASE ET DE L'ACIDE MALIQUE SUR LES PROTOPLASTES DES SOUCHES BrBv IV et 1135	108
1) Etude de la production de l' α -amylase	108
2) Etude de la répression catabolique exercée par le glucose sur la synthèse d' α -amylase	110
3) Action du fluorure de sodium sur la production de l' α -amylase	113
IV. CONCLUSION	114
CONCLUSION GENERALE	116
BIBLIOGRAPHIE	119
ANNEXES TECHNIQUES	

INTRODUCTION

Depuis que Takamine, en 1907, a exploité industriellement pour la première fois la "Takadiastase" la production d'enzymes par fermentation n'a cessé de connaître un essor croissant qui a non seulement permis d'améliorer la technologie de production et d'extraction, mais également de développer nos connaissances de la physiologie microbienne. Grâce à ces progrès une vingtaine d'enzymes ont connu une exploitation industrielle ce qui reste toutefois faible face aux potentiels que représentent les quelques 20 000 enzymes découvertes à ce jour. Il faut savoir qu'à l'heure actuelle la majorité de ces enzymes exploitées industriellement ne sont produites que par quelques espèces fongiques principalement des *Aspergillus* et par quelques espèces bactériennes. Le développement d'une nouvelle souche requiert en effet de longues et coûteuses études pour satisfaire au contrôle toxicologique.

On comprend dès lors que l'industrie mette l'accent sur l'optimisation des productions déjà existantes. Le patrimoine génétique de la souche utilisée, les caractéristiques physico-chimiques de l'enzyme produite, la technologie de fermentation et d'extraction, sont autant de points susceptibles d'être améliorés.

Par une meilleure compréhension de la physiologie de l'organisme utilisé il est également possible d'optimiser les procédés de fermentation. C'est ce dernier point qui a valu au laboratoire de Cryptogamie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I de se voir confier l'étude des facteurs impliqués dans la physiologie de biosynthèse de l' α -amylase chez *A. oryzae*. La souche utilisée dans cette fermentation ayant la particularité d'acidifier occasionnellement les milieux de culture, il nous a été demandé de définir les facteurs à l'origine de cette acidification et de déterminer les méthodes pour éviter cette acidification synonyme d'une perte de production.

MALARD (1981) par une étude comparée de deux souches d'*A. oryzae*, dont les aptitudes à biosynthétiser cette enzyme différaient fortement, a ébauché l'approche de ce problème. Notre travail consistera donc dans un premier temps à identifier les composés acides responsables de la chute de pH dans les milieux de culture, dans un second temps à déterminer les voies métaboliques responsables de leur accumulation et enfin dans un troisième temps nous envisagerons les moyens capables d'agir sur ce métabolisme pour optimiser la biosynthèse de l' α amylase.

CHAPITRE PRELIMINAIRE

INTRODUCTION

Ce travail fait suite à l'étude comparative de la physiologie de la biosynthèse d' α -amylase entreprise par MALARD (1981) sur deux souches d'*Aspergillus oryzae*.

L'emploi de deux souches d'origines différentes et caractérisées par un écart de production d' α -amylase important a permis de cerner les différences physiologiques responsables de l'activité enzymatique de chaque souche.

Avant de les rappeler, nous allons préciser les caractères biologiques propres à l'espèce *Aspergillus oryzae*.

I - CARACTERES GENERAUX

D'ASPERGILLUS ORYZAE

1 - APPLICATION INDUSTRIELLE

L'utilisation d' *A. oryzae* dans les processus fermentaires remonte à plus de 800 ans ; c'est en effet à partir de cette époque, semble-t-il, que les Japonais l'emploient de façon encore empirique dans la fabrication du saké.

Outre son rôle quelque peu anecdotique dans cette production, *A. oryzae* entre dans la préparation d'une gamme assez large d'aliments traditionnels japonais, comme le soy sauce, le méso (sorte de fromage à pâte très molle)..., toutes ces préparations ont en effet comme point commun d'être élaborées à partir d'un substrat connu sous le nom de KOJI et que l'on peut rapprocher dans une certaine mesure de notre malt occidental. Ce composé est obtenu par hydrolyse enzymatique, sous l'action d'*A. oryzae*, d'un mélange complexe formé généralement de farine de riz, de blé, d'orge ainsi que de haricots.

Mais l'utilisation de façon consciente d'*A. oryzae*, coïncidant d'ailleurs avec la première enzyme préparée industriellement, ne débute qu'en 1894 ; c'est à cette période que TAKAMINE fait breveter sa production de "Takadiastase", un mélange d'amylase et de protéase obtenu par fermentation d'*A. oryzae* sur du riz étuvé.

Bien que son champ d'action se soit beaucoup réduit depuis l'apparition de l' α -amylase bactérienne, l' α -amylase fongique, grâce à ses propriétés spécifiques, trouve encore sa place dans l'industrie. Ainsi, dans la fabrication du pain, elle supplée à la déficience des grains de blé en α -amylase formant ainsi préférentiellement à partir de l'amidon du maltose, qui est un substrat de choix pour les levures de boulangerie. Outre son aptitude à former préférentiellement du maltose, l' α -amylase fongique est totalement inactivée à 70-75°C, alors que l' α -amylase bactérienne peut avoir un optimum de température à 90°C voir 100-105°C, ce qui peut entraîner la présence d'une activité rémanente dans le pain, provoquant une altération poussée des caractéristiques de la mie et de la croûte.

2 - POSITION SYSTEMATIQUE

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

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

La différenciation des conidies est du type basipète. Lorsque la phialide a émis une première spore, un second bourgeonnement se produit à un niveau inférieur isolant ainsi une nouvelle conidie. Chez *A. oryzae*, on observe rarement de longues chaînes de conidies. Généralement dès leur formation elles se détachent de la phialide, tout au plus peut-on voir deux ou trois spores encore soudées l'une à l'autre.

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

LE GROUPE FLAVUS-ORYZAE :

Dans leur "Manual of the Aspergilli", THOM et RAPER (1945) indiquent que la détermination précise de l'espèce *Aspergillus oryzae* est délicate. D'après ces auteurs, il semble exister une variation continue

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

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

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

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

3 - LA VARIABILITÉ

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

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

4 - PHYSIOLOGIE DE LA BIOSYNTHESE D' α -AMYLASE

La physiologie de la biosynthèse d' α -amylase a fait l'objet de nombreux travaux dont nous allons rappeler les points essentiels.

A/ INFLUENCE DES CONSTITUANTS DU MILIEU DE CULTURE SUR LA BIOSYNTHESE DE L' α -AMYLASE

- la source de carbone

Parmi les polyosides, l'amidon est généralement cité comme l'élément carboné le plus favorable à la synthèse d' α -amylase, KUNDU et coll. (1972), ANDRZEJCZUK-HYBEL et coll. (1971 a); cependant les auteurs notent qu'un temps de latence assez important affecte à la fois la croissance et la production d'enzymes, dû au fait que l'amidon ne peut être utilisé par le microorganisme qu'après un début d'hydrolyse. D'où l'intérêt porté par DEPRez (1977) aux dextrines en tant que produit d'hydrolyse de l'amidon. Cet auteur montre que ce type de composé permet une synthèse supérieure à l'amidon grâce à la réduction du temps de latence.

Parmi les sucres simples et les oligosaccharides, l'unanimité concernant le meilleur inducteur est loin d'être établie. Pour TONOMURA et coll. (1961), l'inducteur pour être efficace doit avoir une configuration de type α glucosyl-glucose ; ainsi, pour cet auteur, le maltose (glc α 1,4 - glc) et l'isomaltose (glc α 1,6 - glc) sont de loin les meilleurs substrats alors que le glucose est qualifié d'inhibiteur de la synthèse. Pour KUNDU et coll. (1972), au contraire, le glucose est l'inducteur par excellence de la synthèse d' α -amylase.

Parmi les autres sources de carbone non osidiques, seul le citrate de sodium incorporé dans un milieu à base d'amidon affecte positivement la synthèse d' α -amylase (ANDRZEJCKZUK-HYBEL et coll. 1971 b). Il semblerait que l'acide citrique entraîne une concentration intracellulaire de certains métabolites liés au cycle de Krebs et en particulier du glutamate et de l'aspartate dont l'action bénéfique sur la synthèse a été démontrée (KUNDU et coll., 1972).

- la source d'azote

KUNDU et coll. (1970) montrent que pour des rapports C/N élevés, c'est-à-dire 2% d'amidon et 0,05% d'azote, une source d'azote minérale convenait mieux à la synthèse. MEYRATH (1975), quant à lui, préconise des concentrations d'azote plus élevées et dans ce cas, pour éviter l'acidification du milieu, il est préférable d'utiliser une source d'azote organique.

Pour DEPREZ, la synthèse optimum d' α -amylase était quant à elle obtenue grâce à un mélange de glutamate de sodium et d'urée.

- les éléments minéraux

Pour KUNDU et coll. (1972), les ions métalliques affectant la synthèse d' α -amylase sont le Mg^{2+} et le Ca^{2+} ; l'ion Mg^{2+} joue un rôle positif sur la synthèse alors que l'ion Ca^{2+} diminue de façon sensible cette synthèse. Pour ces auteurs, l'effet antagoniste de Mg^{2+} et Ca^{2+} est à rechercher dans leur rôle respectif sur les hexokinases qui seraient inhibées par Ca^{2+} et activées par Mg^{2+} .

Certains auteurs (MALKOV et DEEVA, 1961) rapportent que des sels tels NaF , NaN^3 ou KCN peuvent, à de faibles concentrations,

inhiber la chaîne respiratoire et de cette façon, semble-t-il, favoriser la synthèse d' α -amylase.

Le rôle du phosphore est, quant à lui, très controversé. Pour KOZYRIOVA (1971), un milieu ne contenant qu'une faible concentration en phosphore favorise le passage de l'enzyme de la cellule au milieu extérieur, alors que pour YABUKI et FUKUI (1971) ainsi que pour TONOMURA et coll. (1963), la libération de la protéine dans le filtrat serait liée à des concentrations élevées en phosphore des milieux de culture.

B/ MECANISMES REGULATEURS DE LA BIOSYNTHESE

Si d'une manière générale tous les auteurs s'accordent à voir dans la paroi l'élément principal de la régulation de la biosynthèse de l' α -amylase, par contre les avis divergent quant aux mécanismes impliqués dans cette régulation.

Pour l'école soviétique (YURKEVITCH et KOZYRIOVA, 1967, 1972 ; KOZYRIOVA 1971), c'est l' α -amylase elle-même qui assure sa propre régulation au niveau de la paroi. En ajoutant au milieu de culture des concentrations croissantes d' α -amylase purifiées, on atteint un seuil où la synthèse d' α -amylase est totalement inhibée ; cela traduit pour ces auteurs la régulation de l' α -amylase sur sa propre synthèse, d'autant plus que seule l' α -amylase native est à l'origine de ce phénomène et que des protoplastes d'*Aspergillus oryzae* perdent toute sensibilité à la concentration en α -amylase du milieu.

Pour l'école japonaise (YABUKI et FUKUI 1970), la libération de l' α -amylase dans le milieu extérieur passerait par la synthèse d'un composé protéinique appelé "Masking factor". Avant d'être excrétée, l' α -amylase serait, selon ces auteurs, fixée sur la paroi cellulaire puis la synthèse du Masking factor, dont l'affinité pour les sites de fixation est plus grande que l' α -amylase, déplacerait l'équilibre, libérant ainsi l'enzyme dans le milieu.

A l'issue de cette revue bibliographique, il apparaît que l'étude de la synthèse de l' α -amylase aboutit souvent à des résultats contradictoires. Il semble que cette diversité provienne non seulement de la large variété des souches utilisées, mais aussi de la variabilité de leur patrimoine génétique (ISHITANI et coll. 1975).

II - CARACTERES PARTICULIERS AUX SOUCHES BRBV IV ET 1135

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

1 - CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES SOUCHES BRBV IV ET 1135

La variabilité chez *A. oryzae* est bien illustrée par la souche BrBv IV qui sur tous les milieux étudiés présente une sectorisation abondante ; la souche 1135 par contre, dans nos conditions culturales, n'a jamais présenté une telle particularité.

La souche 1135 sporule toujours plus faiblement que la souche BrBv IV sauf sur Czapeck où cette dernière ne donne qu'un mycélium peu abondant et de rares secteurs sporulés. Sur milieu au malt la sporulation est intense pour cette souche, alors qu'elle reste à un niveau moyen pour la souche 1135. Lorsque les conidies sont encore jeunes, la couleur est très différente selon la souche, vert clair pour 1135 et jaune d'or pour BrBv IV. Toutefois, à maturité, elles deviennent vert foncé pour les deux souches et ont tendance à brunir en vieillissant.

Le diamètre moyen d'une conidie pour la souche BrBv IV est de $4,68 \pm 0,6 \mu$ et de $4,8 \pm 0,1$ pour la souche 1135.

2 - CARACTERISTIQUES CULTURALES DES SOUCHES BRBV IV ET 1135

Les particularités physiologiques de la biosynthèse d' α -amylase des souches BrBv IV et 1135 sur lesquelles repose notre étude ont été étudiées par MALARD (1981).

En fonction de diverses sources de carbone, MALARD a dégagé un comportement particulier à chaque souche. C'est ce comportement sur maltose et glucose, deux substrats types, que nous rappelons ici.

A/ INFLUENCE DU MALTOSE SUR LA SYNTHÈSED'α-AMYLASE CHEZ LES SOUCHES BrBv IV ET 1135

A 96 heures, le titre amylolytique de la souche BrBv IV est de 1500 PS-50/ml*, alors que dans les mêmes conditions la souche 1135 produit 100 PS-50/ml d'α-amylase. La croissance identique pour les deux souches subit à 48 heures une inflexion chez 1135 par rapport à la souche BrBv IV ; à 96 heures ce ralentissement sensible de la croissance se traduit par un poids en matière sèche inférieur d'environ 20% à celui de la souche BrBv IV.

Après 96 heures de culture, on enregistre une chute importante de la croissance (DEPREZ, 1977) consécutive à une lyse du mycélium, lyse qui, selon VALLIER et coll. (1977), débute dès que le pH est supérieur à 7,2. L'influence de ce phénomène sur la concentration d'α-amylase présente dans le milieu de culture est très controversée ; pour VALLIER et coll. (1977), ADAMS (1981), la lyse du mycélium est directement impliquée dans la libération de l'enzyme alors que YABUKI et coll. (1977), YURKEVITCH et KOZYRIOVA (1967) font intervenir un transport actif. Dans nos conditions expérimentales, après 120 heures de culture, la souche 1135 présente une perte d'activité amylosique alors que BrBv IV présente un accroissement de 5 à 10% de cette activité ; pour éviter de telles interactions les expérimentations ont lieu dans une zone où la lyse intervient le moins possible.

L'évolution du pH au cours des cultures est aussi une caractéristique physiologique de chaque souche ; pendant les trois premiers jours le pH reste stable chez BrBv IV, alors que chez 1135 il atteint des valeurs comprises entre 5,2 et 5,6 à 48 heures ; à 96 heures on relève une identité de comportement entre les deux souches avec des valeurs proches de pH 8. De plus, MALARD montre que la souche 1135 présente, avec un coefficient de corrélation de 0,96, une relation étroite entre le poids de matière sèche et le pH du milieu de culture, relation qui n'a pu être mise en évidence chez BrBv IV.

B/ INFLUENCE DU GLUCOSE SUR LA SYNTHÈSED'α-AMYLASE CHEZ LES SOUCHES BrBv IV ET 1135

Une très nette diminution de la production d'α-amylase est enregistrée lorsqu'on remplace le maltose par du glucose. Pour la souche

* PS-50/ml = nombre de cg de maltose produit en 1 heure à 50°C par l'action de 1 ml de filtrat du milieu de culture sur une solution d'amidon soluble.

Planche 1 : croissance, évolution du pH et synthèse d' α -amylase des souches BrBv IV et 1135 cultivées sur maltose.

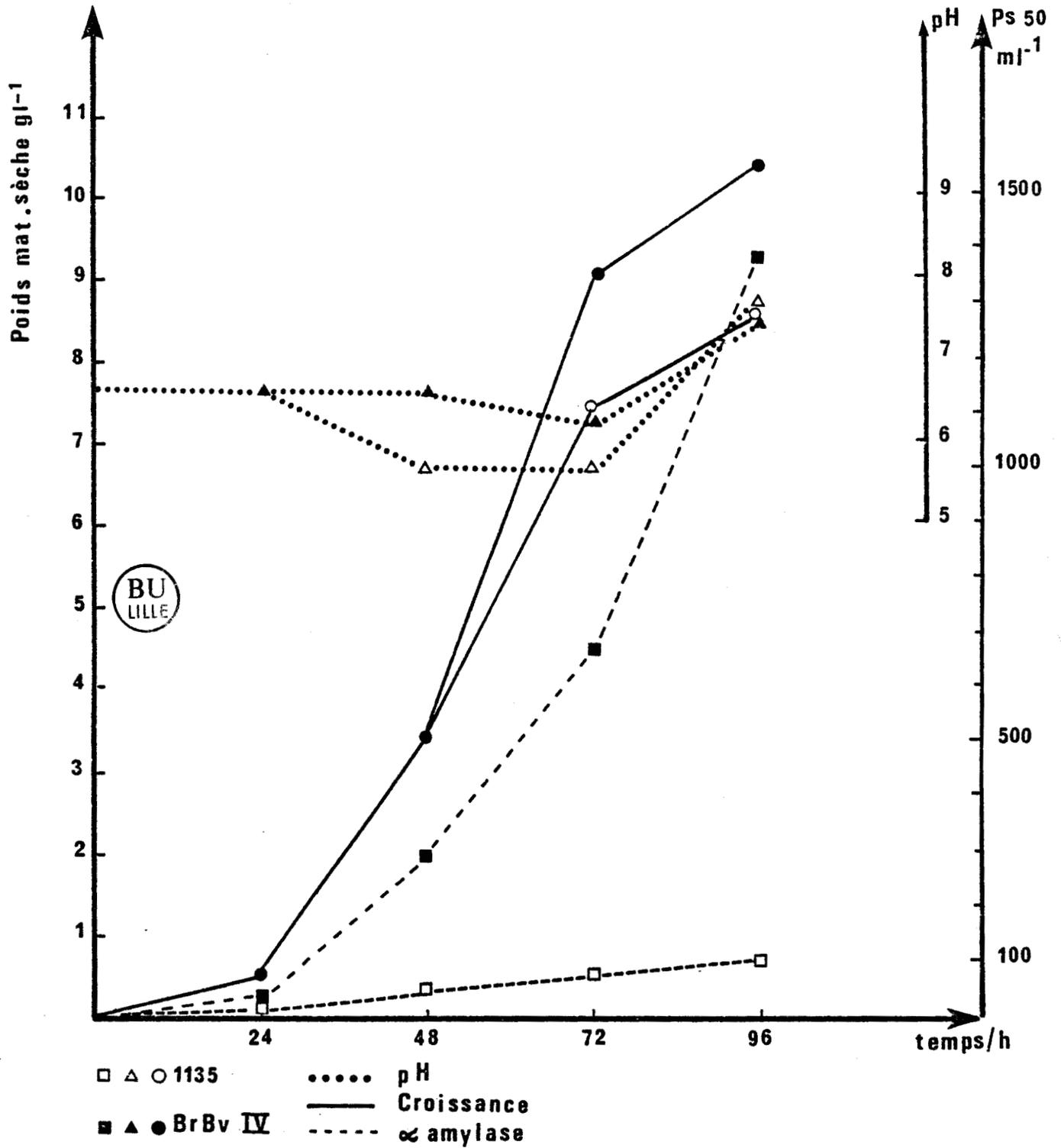
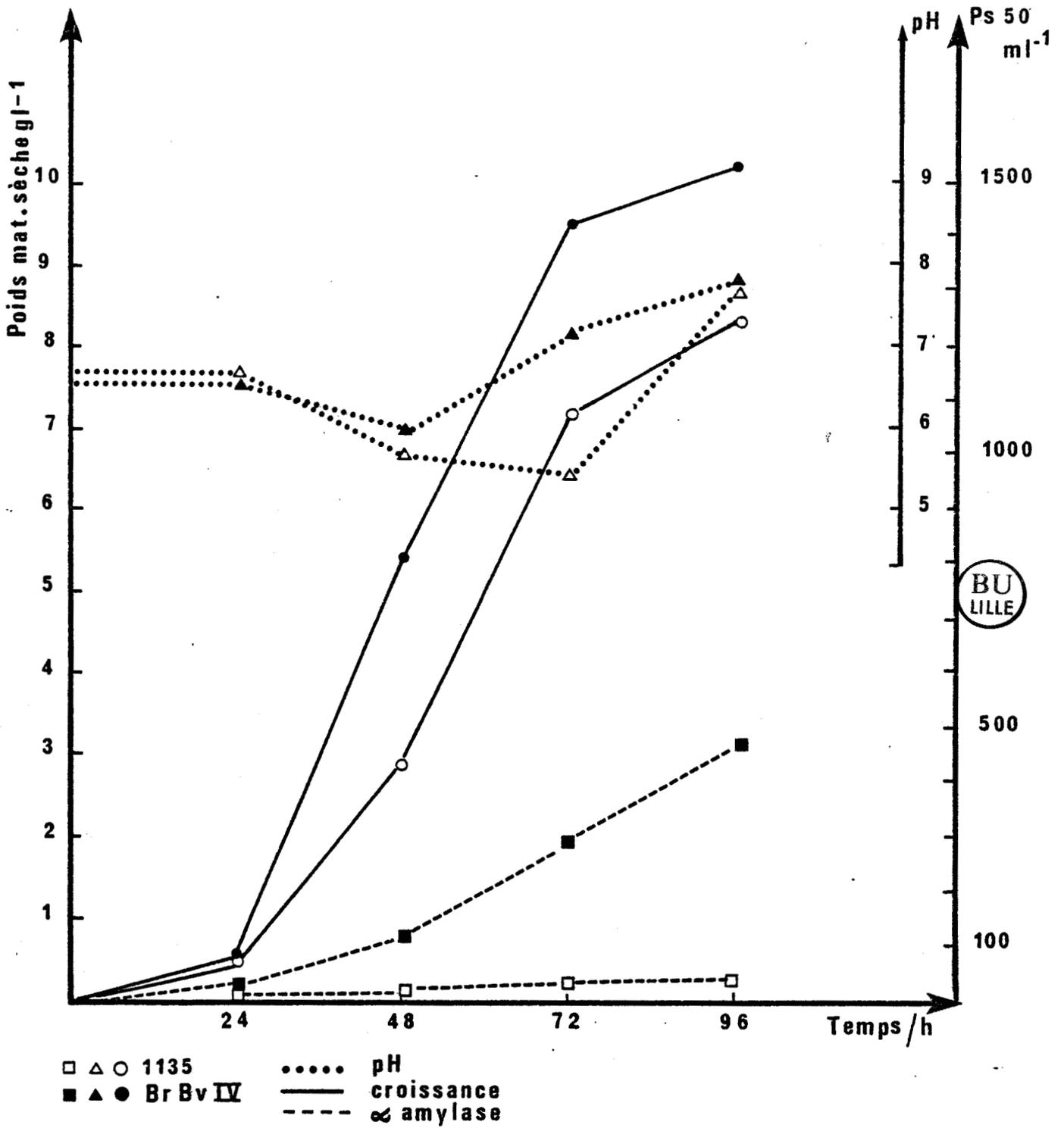


Planche 2 : croissance, évolution du pH et synthèse d' α -amylase des souches BrBv IV et 1135 cultivées sur glucose.



BrBv IV seul le tiers de la synthèse sur milieu de référence est obtenu alors que pour la souche 1135 on assiste à une réduction de moitié.

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

L'évolution du pH montre cependant une différence, puisqu'une chute de pH se produit à 48 heures pour la souche BrBv IV cultivée sur glucose, alors que pour la souche 1135 l'évolution du pH sur ce milieu est tout à fait comparable à celle obtenue sur maltose. Néanmoins, il ressort des travaux de MALARD que, si la modification des conditions culturales change profondément la valeur des activités amylasiques, le sens et l'amplitude de ces variations demeurent identiques pour les deux souches, d'où la conclusion qu'en dépit de leur physiologie particulière les deux souches possèdent un mécanisme de synthèse de l' α -amylase identique.

S'il est généralement admis que ces mécanismes sont inducibles, la nature des composés impliqués dans cette induction reste obscure. KUNDU et coll. (1972) placent par ordre d'efficacité décroissante le glucose suivi du maltose et des maltodextrines alors que pour TONOMURA (1961) le glucose est un inhibiteur de la synthèse. Chez les souches BrBv IV et 1135, l'optimum de production d' α -amylase est atteint en présence d'isomaltose, de maltose et des maltodextrines. Le glucose quant à lui n'est que peu favorable à la synthèse d' α -amylase.

Il est possible que ces divergences dans la nature de l'inducteur soient liées à son catabolisme ; on sait en effet qu'en fonction de la nature de la souche de carbone introduit, certaines voies métaboliques seront favorisées. C'est le cas en particulier de l'acétate qui induit le shunt glyoxylique par la dérégulation de l'isocitratase (SMITH et GUNSALUS, 1955) ou celui du malonate, qui bloque l'activité succinodéshydrogénase du cycle tricarboxylique (THORN, 1953). L'orientation du métabolisme sous l'influence d'un substrat particulier peut se faire soit dans le sens d'une plus grande oxydation, soit dans le sens d'une plus grande réduction. A cet égard, l'effet répressif du glucose sur le fonctionnement des voies oxydatives a été montré à plusieurs reprises et en particulier chez *A. niger* par NG et coll. (1973). Or, pour de nombreux auteurs, un lien direct existe entre l'excrétion des acides organiques et un métabolisme de type réducteur. Nous avons donc émis l'hypothèse que le métabolisme de la souche BrBv IV pouvait être de type oxydatif en opposition au métabolisme de la souche 1135 qui, lui, serait réducteur.

III - PLAN DU TRAVAIL

Partant d'une telle hypothèse, nous avons projeté d'étudier dans un premier temps la physiologie de la biosynthèse de l' α -amylase et plus précisément les composés acides accumulés dans les milieux de culture. Cette accumulation résultant probablement d'une inhibition ou d'une répression du métabolisme intermédiaire, nous étudierons ensuite *in vitro* les enzymes qui nous paraîtront directement ou indirectement impliquées dans ce phénomène. En fonction des voies métaboliques mises en cause nous tenterons ensuite d'apporter une explication au comportement particulier de chaque souche.

Dans un deuxième temps, nous envisagerons sur le mycélium puis sur les protoplastes des deux souches les moyens à mettre en oeuvre pour interférer sur les mécanismes responsables de l'acidification et ainsi tenter d'imposer aux souches une production d' α -amylase exempte d'acides organiques.

Dans un souci d'homogénéité nous avons préféré regrouper les rubriques techniques des différents chapitres en annexe de cette thèse.

Les expériences issues de ces techniques ont fait l'objet d'un minimum de 4 répétitions et la standard-déviations des résultats obtenus a été calculée ; de plus la comparaison éventuelle de ces résultats a toujours été associée aux tests de Fisher appliqués aux petits échantillons.

Le lecteur trouvera également en annexe le schéma des trois voies métaboliques sur lesquelles repose notre étude, à savoir : la voie d'Emden-Meyerhof-Parnas, la voie des hexoses monophosphates et le cycle de Krebs complété de ses voies annexes.

CHAPITRE I

PHYSIOLOGIE DE L'ACCUMULATION DES ACIDES ORGANQUES DANS LES MILIEUX DE CULTURE

INTRODUCTION

WHEMER, dès 1891, relate que les moisissures sont capables à partir des glucides de produire et d'excréter des acides organiques en quantité importante dans les milieux de culture. Ainsi, en 1893, les premiers essais de production d'acide citrique furent tentés en cultivant un *Penicillium*. Plus tard, diverses espèces du genre *Aspergillus* et plus particulièrement *A. niger* furent reconnues comme susceptibles d'accumuler dans leur filtrat une gamme relativement large d'acides organiques. A l'heure actuelle, la plupart de ces composés produits industriellement par fermentation le sont par cette dernière espèce.

Chez *Aspergillus oryzae*, l'accumulation massive d'acides organiques dans les filtrats de culture semble se restreindre à l'acide kojique. Cependant, leur appartenance au genre *Aspergillus* rend les deux souches d'*A. oryzae* utilisées dans ce travail susceptibles de produire divers acides organiques dont l'excrétion dans les filtrats de culture pourraient être responsables des chutes de pH constatées par MALARD. Aussi notre première tâche dans ce chapitre consistera à identifier le ou les acides susceptibles d'être à l'origine de ces variations de pH dans les filtrats de culture. Dans un second temps, nous modifierons la source de carbone, puis la source d'azote, pour tenter de préciser le déterminisme de leur production.

Planche 3 : croissance, évolution du pH et synthèse d' α -amylase de la souche BrBv IV cultivée sur milieu Deprez et milieu Deprez modifié.

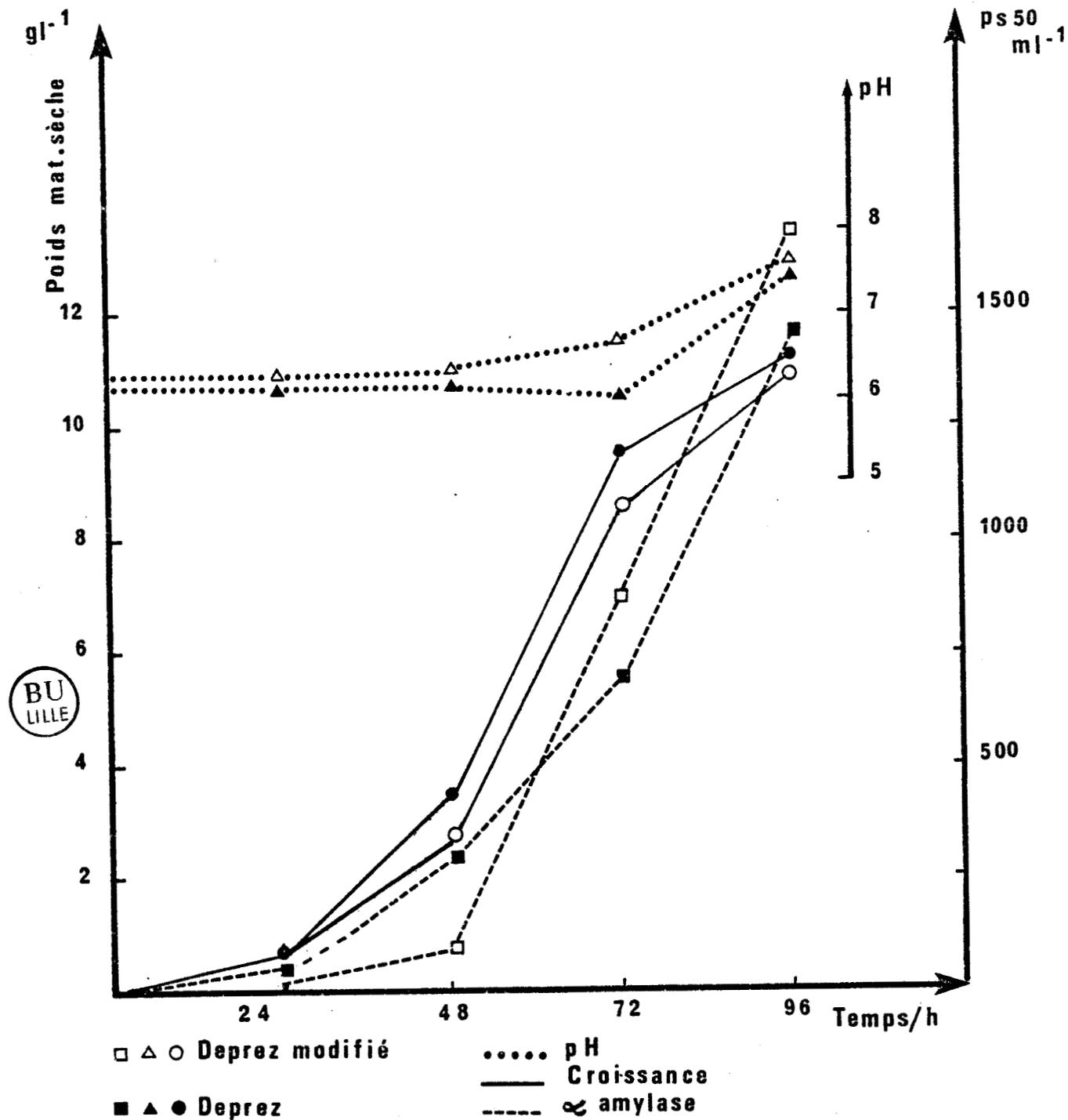
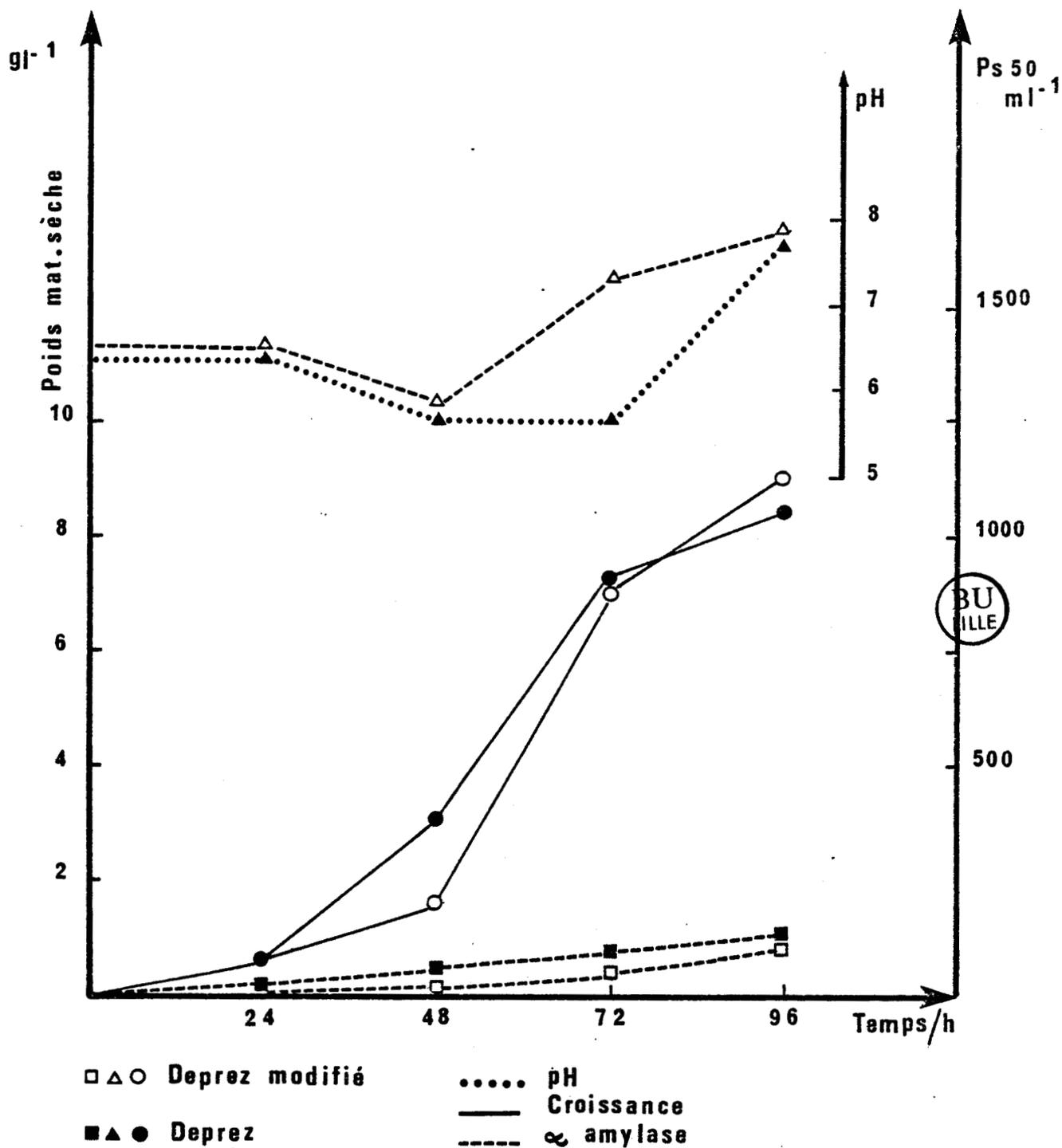


Planche 4 : croissance, évolution du pH et synthèse d' α -amylase de la souche 1135 cultivée sur milieu Deprez et milieu Deprez modifié.



I - PRODUCTION D' α -AMYLASE SUR MILIEU DEPREZ MODIFIE

Pour cette étude, il était nécessaire de disposer d'un milieu synthétique autorisant une synthèse d' α -amylase associée à la bonne reproduction des résultats.

Partant de ces impératifs, DEPREZ (1977) a élaboré un milieu dont la composition est la suivante :

source de carbone	30 g
glutamate de sodium monohydraté	34 g
urée	6 g
KH_2PO_4	1,6 g
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, \text{H}_2\text{O}$	0,8 g
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	0,02 g
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
eau distillée QSP	1000 ml

Pour nos travaux, nous avons apporté quelques modifications à ce milieu ; en effet, après autoclavage apparaissait un précipité de CaSO_4 persistant après 24 heures de culture. Nous avons éliminé ce précipité, incompatible avec nos travaux sur le mycélium broyé, en réduisant la teneur en $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ à 0,2 g/l. Nous avons également amélioré le pouvoir tampon du milieu aux ions H^+ en ajoutant du dihydrogénophosphate de potassium. Pour respecter le pH et l'apport initial en ions PO_4^{3-} le milieu a été supplémenté comme suit :

K_2HPO_4	1,7 g
KH_2PO_4	0,8 g

Comparé aux résultats obtenus par MALARD (1981), le milieu DEPREZ modifié ou milieu de référence n'apporte pas de variation profonde dans le comportement des deux souches. Nous ferons cependant deux remarques :

1°) l'amélioration du pouvoir tampon n'est pas suffisant pour compenser la chute de pH résultant de la surcharge d'ions H^+ libérés par la souche 1135.

2°) le profil d'accumulation de l' α -amylase dans le milieu de culture diffère sensiblement d'un milieu à l'autre. Rappelons que la méthode de dosage de l' α -amylase est basée sur un dosage spectrophotométrique des fonctions réductrices libérées par l'hydrolyse d'une solution d'amidon. Or, pendant les 48 premières heures de croissance, où la production d' α -amylase est encore faible, la présence d'un substrat réducteur peut interférer de façon marquée sur les résultats. Les planches 3 et 4 montrent que le profil d'accumulation de l' α -amylase dans les milieux de culture, corrigé des interférences, est quelque peu différent des résultats de MALARD, notamment à 24 heures où nous n'avons pu déceler d'activité enzymatique.

II - IDENTIFICATION DES COMPOSES ACIDES PRESENTS DANS LES FILTRATS DE CULTURE

La présence de composés acides dans les filtrats de culture étant liée à la chute de pH, nous avons entrepris leur identification à partir de culture de souches BrBv IV et 1135 sur milieu de référence glucosé, substrat sur lequel l'acidification des milieux s'est révélée la plus prononcée. Une fois ces acides identifiés, nous étudierons la cinétique de leur production sur quatre substrats qui seront le maltose, le glucose, le saccharose et l'acétate de sodium.

1 - RECHERCHE DE L'ACIDE KOJIQUE DANS LES FILTRATS DE CULTURE

A. oryzae étant susceptible d'accumuler de l'acide kojique, nous avons recherché sa présence dans les filtrats de culture par la méthode préconisée par IKEDA et coll., 1956. (Annexe technique n°7). Nous n'avons pu de cette façon obtenir de résultats positifs laissant à penser que l'acide kojique serait accumulé par nos deux souches.

Des techniques d'identification moins sélectives ont donc été utilisées et en premier lieu la chromatographie couche mince (annexe technique n° 2).

2 - IDENTIFICATION DES COMPOSES ACIDES PRESENTS DANS LES FILTRATS DE CULTURE PAR CHROMATOGRAPHIE COUCHE MINCE

Dans les systèmes solvants employés, nous avons obtenu pour les acides de référence les R_f suivants :

Tableau 1 : R_f des acides organiques de référence.

Acide de référence	Solvants	
	Ibu./Ac. formique	Eth./Am./Eau
Gluconique	9,7	33
Oxalique	14	12
Citrique	34	10
Isocitrique	34	10
Glutamique	37	5
Malique	44	25
α -cétoglutarique	50	31
Glycolique	56	47
Malonique	61	20
Pyruvique	67	19
Glyoxylique	68	7
Fumarique	82	39
Itaconique	85	32

Pour les différentes fractions de filtrat de culture, nous avons obtenu les résultats suivants :

Tableau 1 bis : R_f des spots enregistrés sur les différentes fractions de filtrats de culture des souches BrBv IV et 1135 cultivées sur glucose.

Système solvant	R_f des spots enregistrés	BrBv IV				1135			
		24	48	72	96	24	48	72	96
Iso-Butanol/ Ac. formique	37	+	+	+	+	+	+	+	+
	44	-	+	+	-	-	+	+	+
	50	-	-	+	+	-	-	+	+
Ethanol/ Ammoniaque/ Eau	5	+	+	+	+	+	+	+	+
	25	-	+	+	-	-	+	+	+
	39	-	-	+	+	-	-	+	+

Dans les filtrats de culture des deux souches, nous retrouvons constamment une tache de Rf 37 et 5 qui pourrait être assimilée à l'acide glutamique composé initialement présent à 34 g l^{-1} . Apparaît à 48 heures chez les souches BrBv IV et 1135 un spot pouvant être apparenté à l'acide malique ; à 72 heures ce spot persiste d'une façon très nette chez la souche 1135 alors que chez la souche BrBv IV la tâche est plus ténue.

On observe à 72 heures et de façon plus prononcée à 96 heures chez les souches BrBv IV et 1135, un spot dont le Rf pourrait correspondre à l'acide α -cétoglutarique. Cependant, l'identification de composé à partir d'un catalogue de référence aussi restreint est toujours aléatoire, aussi avons-nous élué ces spots et recherché la présence d'activité enzymatique spécifique à chaque acide présumé.

Pour révéler la présence d'acide glutamique, nous avons utilisé le kit de dosage de l'acide L glutamique de chez Boehringer. Pour l'acide malique, nous avons employé le kit acide L malique. Pour l'acide α -cétoglutarique, nous avons employé la technique énoncée dans l'annexe. technique n°9.

Tableau 2 : Identification par voie enzymatique des acides organiques présents dans les filtrats de culture des souches BrBv IV et 1135 cultivées sur glucose.

Acide recherché	Souche cultivée	Temps de culture				
		0h	24h	48h	72h	96h
Acide glutamique	BrBv IV	-	+	+	+	+
	1135	-	+	+	+	+
Acide malique	BrBv IV	-	-	+	+	+
	1135	-	-	+	+	+
Acide α -cétoglutarique	BrBv IV	-	-	-	-	+
	1135	-	-	-	+	+

Les réactions positives obtenues sur les éluats permettent désormais d'établir un lien direct entre la chute de pH et la présence d'acide malique, l'apparition de l'acide α -cétoglutarique à 72 h lui ôtant tout rôle prépondérant dans ce phénomène. De plus, l'analyse enzymatique confirme que le spot de Rf 37 et 5 correspond à l'acide glutamique en excès dans le milieu de culture.

3 - DOSAGE ENZYMATIQUE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE ET DE L'ACIDE MALIQUE

Les kits Boehringer nous ont permis le dosage de l'acide glutamique et de l'acide malique présents dans les filtrats de culture des deux souches et ce pour les quatre substrats étudiés. Ces résultats seront repris dans les planches 5 à 11.

4 - IDENTIFICATION DES ACIDES ORGANIQUES PRESENTS DANS LES FILTRATS DE CULTURE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION

Un prétraitement des échantillons à analyser nous a permis d'éliminer toutes les fractions non acides, clarifiant ainsi les chromatogrammes obtenus ; le glutamate de par sa fonction NH_2 sera éliminé des échantillons et ne pourra donc être décelé par cette méthode.

Comparé aux chromatogrammes de référence nous retrouvons dans les filtrats de culture la présence d'acide malique et d'acide α -céto-glutarique. La chromatographie liquide haute pression nous a aussi permis de déceler des traces d'acides succinique, fumarique, oxaloacétique et citrique. Cependant la présence de ces traces au fil des expériences n'apparaît pas comme une constante ; en effet une modification des conditions culturales peut entraîner une variation importante, tant dans la concentration des acides produits que dans le profil de leur apparition. Ainsi, un inoculum composé de conidies ayant séjourné à $+4^\circ\text{C}$ entraînera un décalage vers 72 h du maximum de production de l'acide malique (décalage sans doute associé au phénomène de latence de la croissance mycélienne). Un inoculum 10 fois supérieur aux conditions normales (10^5 conidies) entraînera l'apparition de concentrations non négligeables d'acide succinique et oxaloacétique aux dépens de l'acide malique.

Néanmoins, la chromatographie liquide haute pression nous a permis de doser avec régularité l'acide α -céto-glutarique et l'acide malique corroborant pour ce dernier les résultats obtenus par voie enzymatique.

Tous ces résultats seront repris dans les planches n° 5 à 11, lesquelles permettront également de suivre l'évolution de plusieurs paramètres lors des cultures des souches BrBv IV et 1135 sur les quatre substrats déjà évoqués à savoir le maltose, le glucose, le saccharose et l'acétate de sodium. Ces paramètres sont : l'assimilation de la source de carbone et du glutamate en tant que source d'azote, le pH, la croissance et la production d' α -amylase.

planche 5 : Croissance, évolution du pH et concentration résiduelle en acétate et glutamate des souches BrBv IV et 1135 cultivées sur acétate de sodium.

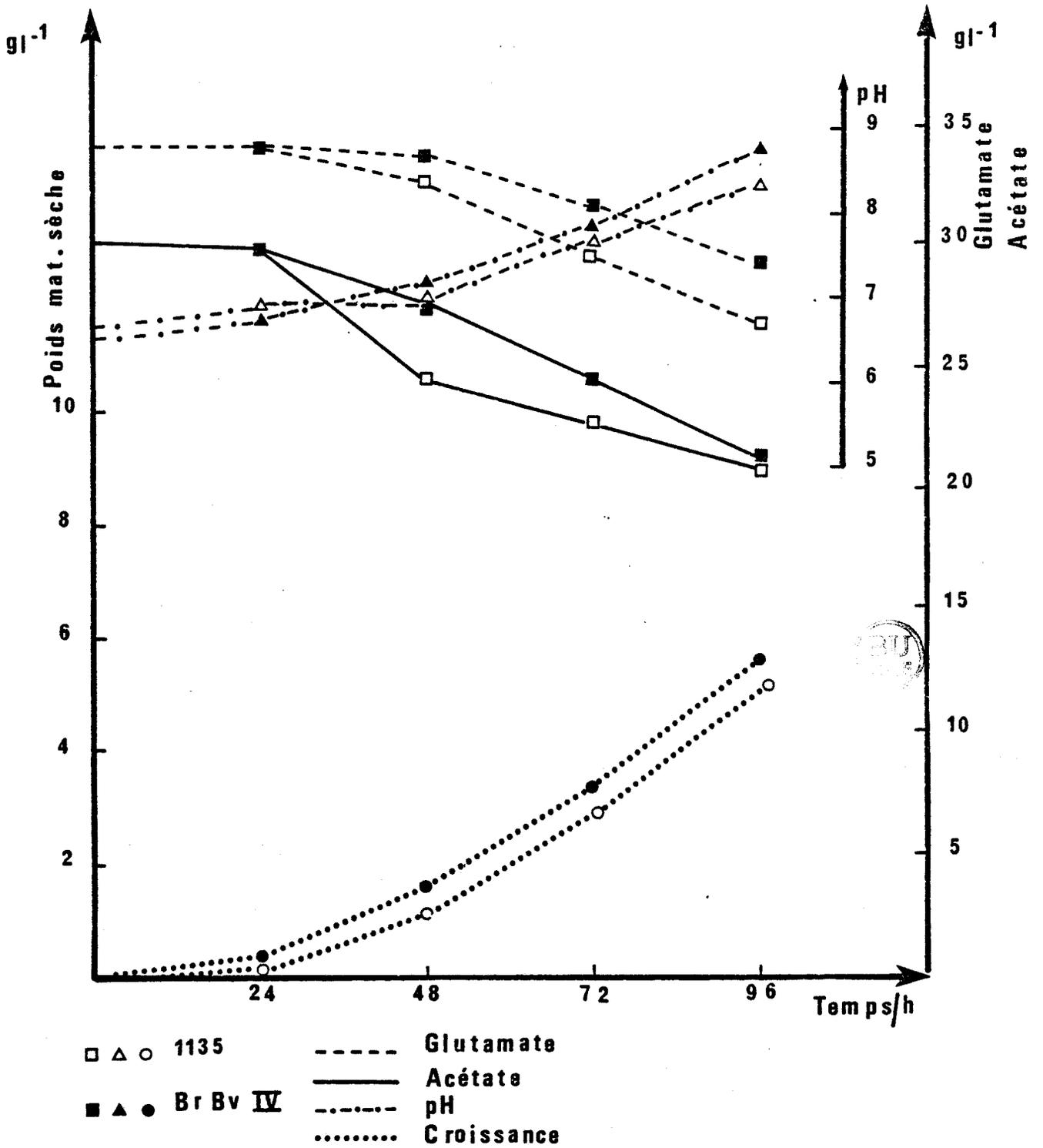
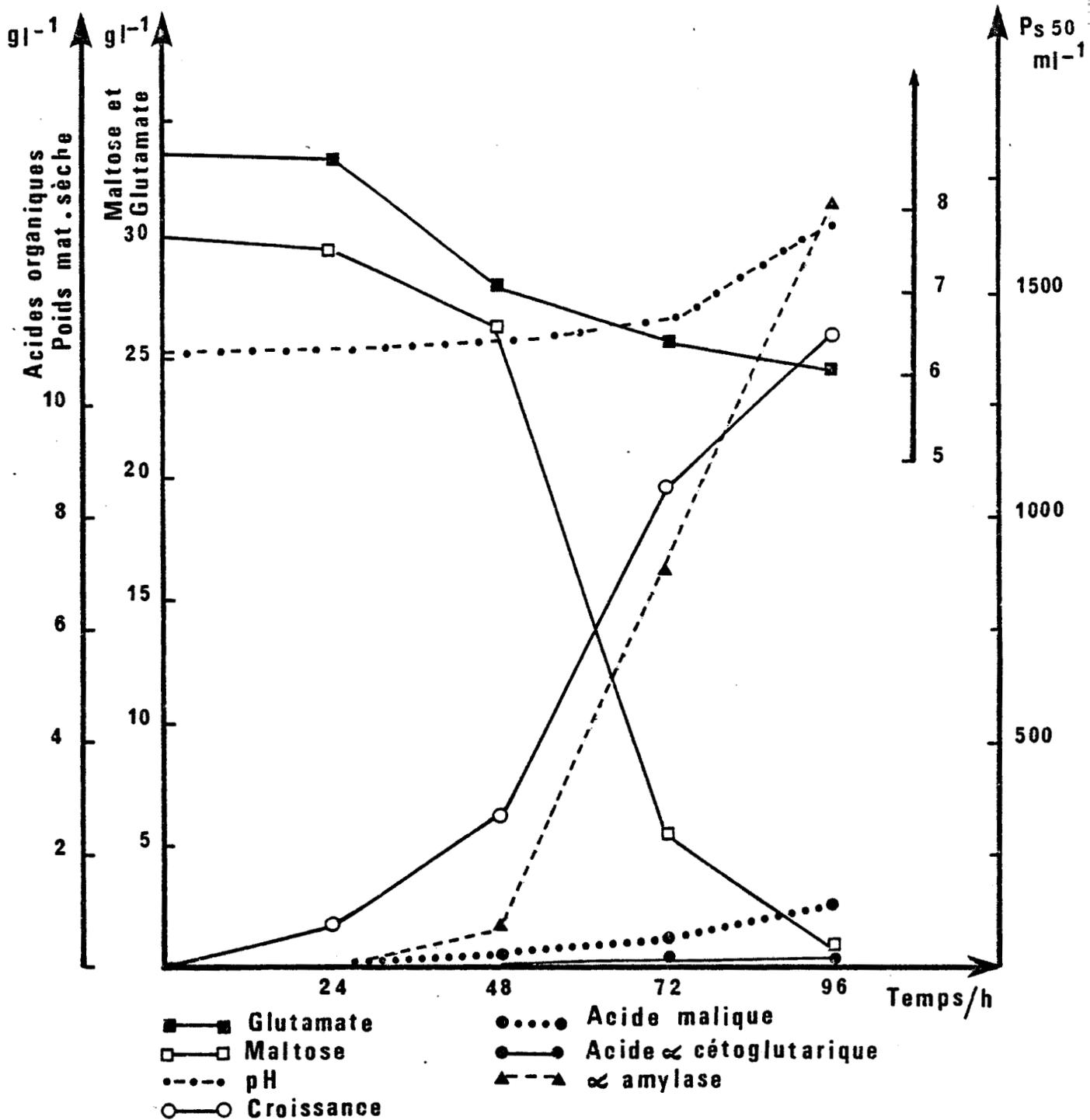


planche 6 : croissance, évolution du pH, synthèse d' α -amylase, production d'acides organiques et concentrations résiduelles en maltose et glutamate de la souche BrBv IV cultivée sur maltose.



planchette 7 : croissance, évolution du pH, synthèse d' α -amylase, production d'acides organiques et concentrations résiduelles en maltose et glutamate de la souche 1135 cultivée sur maltose.

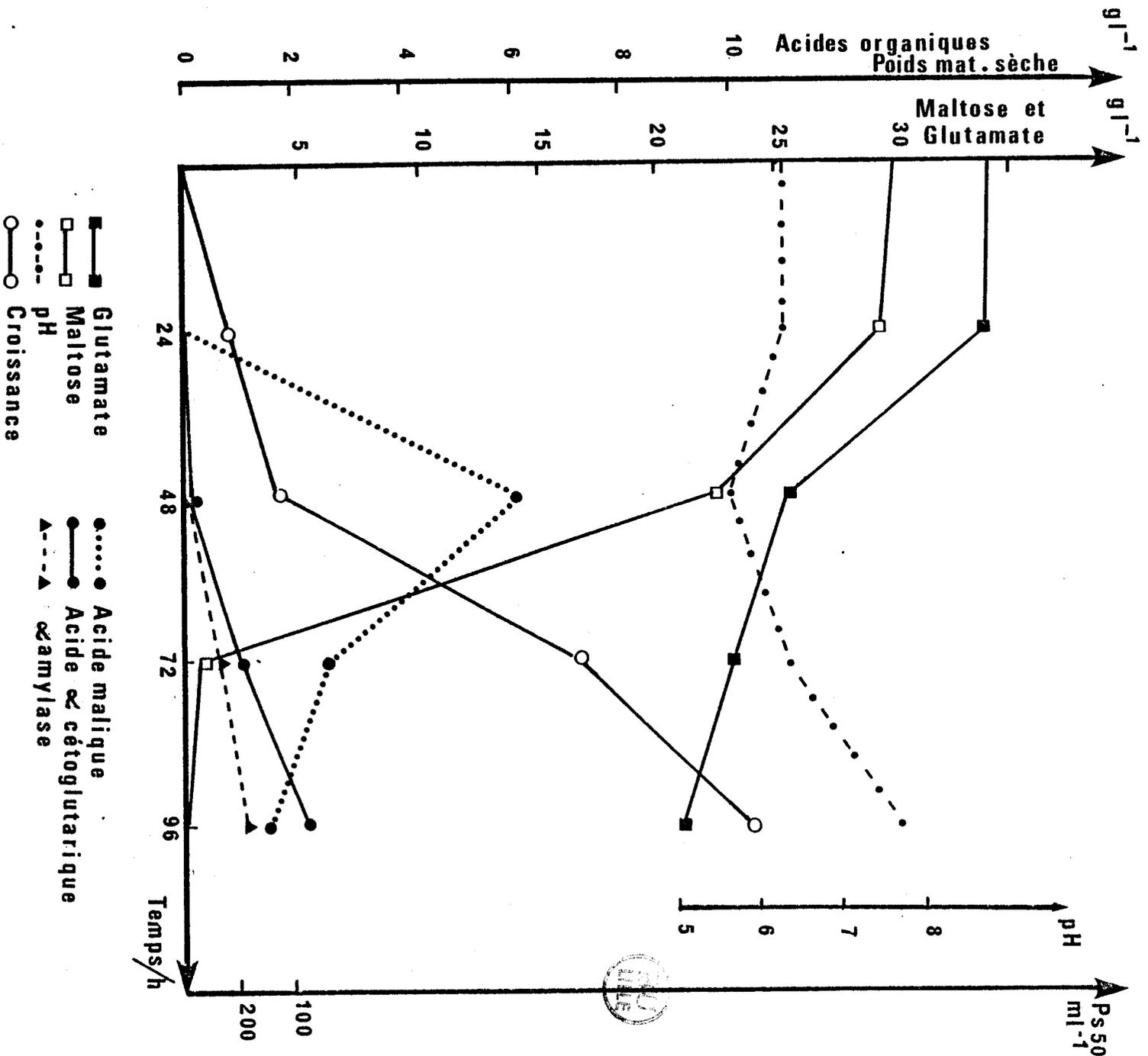


planche 8 : croissance, évolution du pH, synthèse d' α -amylase, production d'acides organiques et concentrations résiduelles en glucose et glutamate de la souche B1Bv IV cultivée sur glucose.

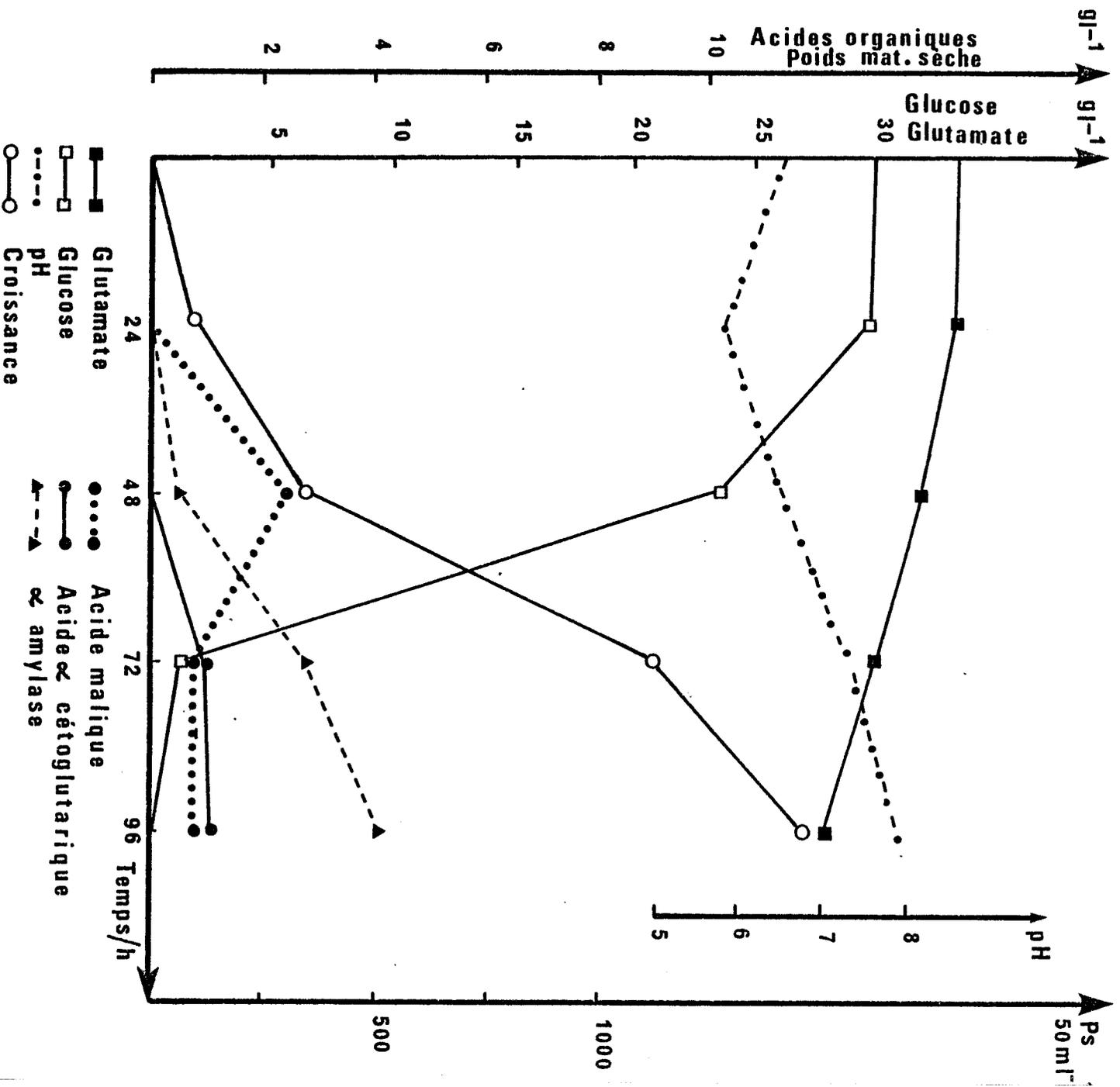


planche 9 : croissance, évolution du pH, synthèse d' α -amylase, production d'acides organiques et concentrations résiduelles en glucose et glutamate de la souche 1135 cultivée sur glucose.

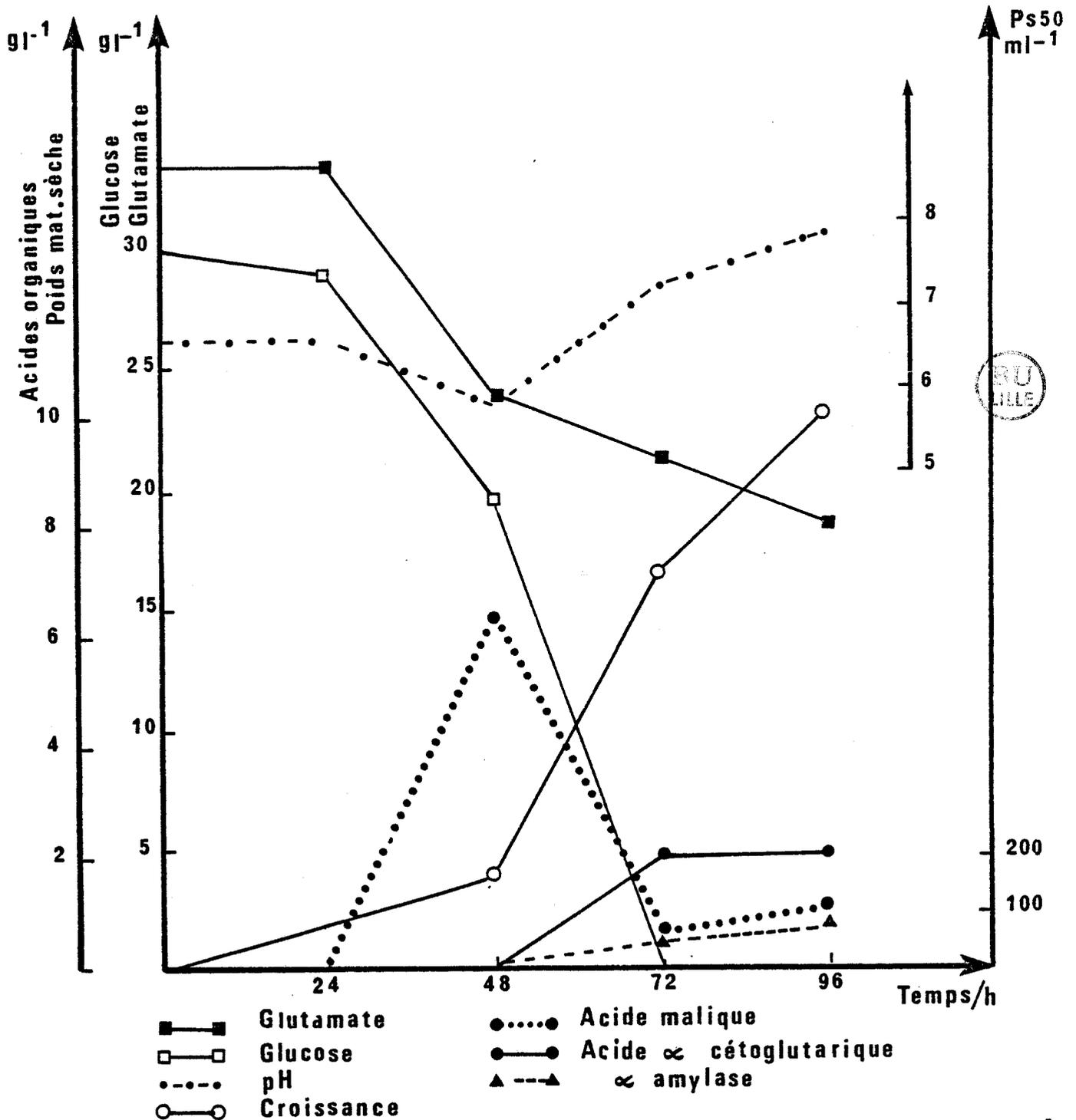


planche 10 : croissance, évolution du pH, synthèse d' α -amylase, production d'acides organiques et concentrations résiduelles en saccharose et glutamate de la souche BrBv IV cultivée sur saccharose.

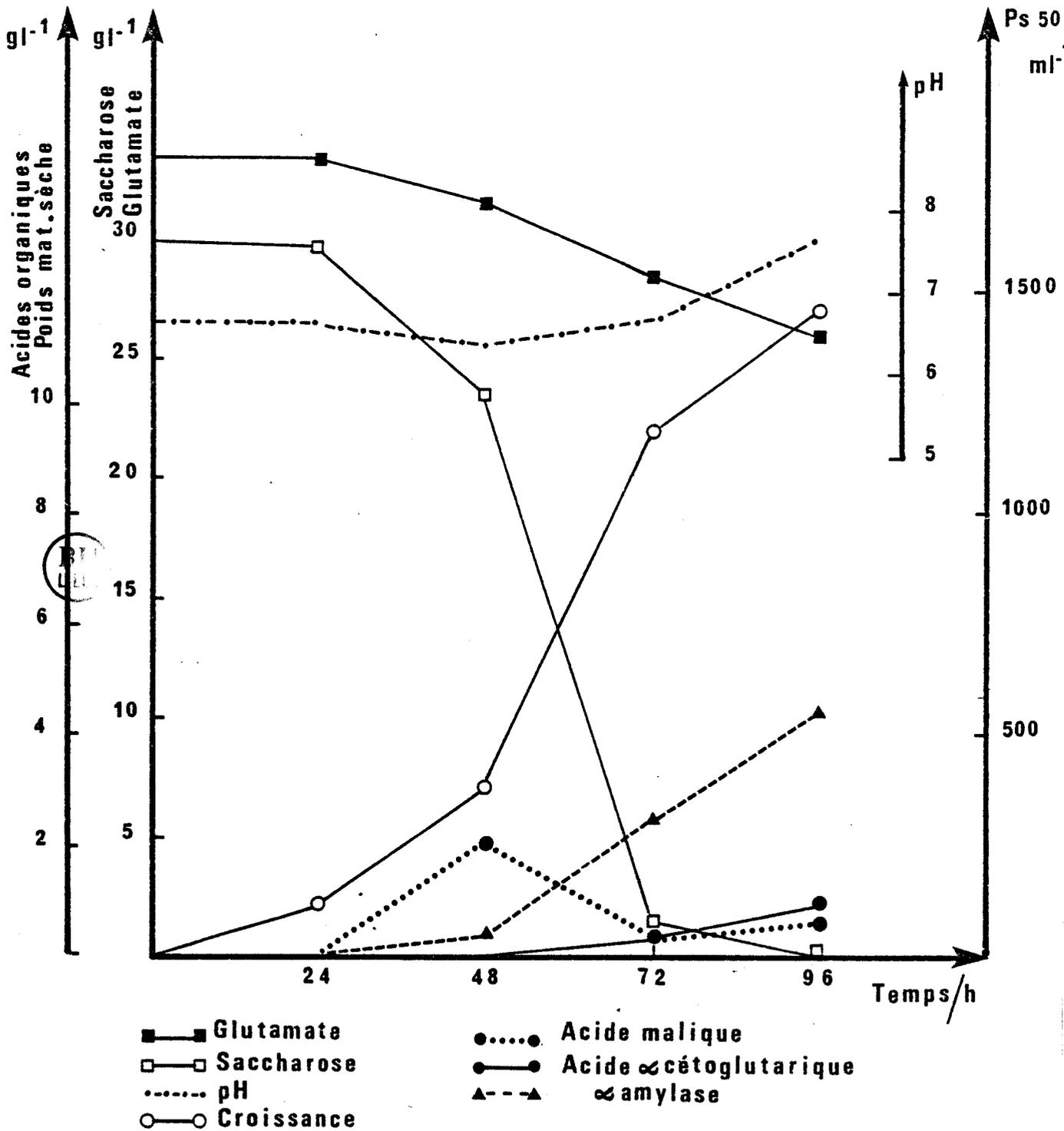
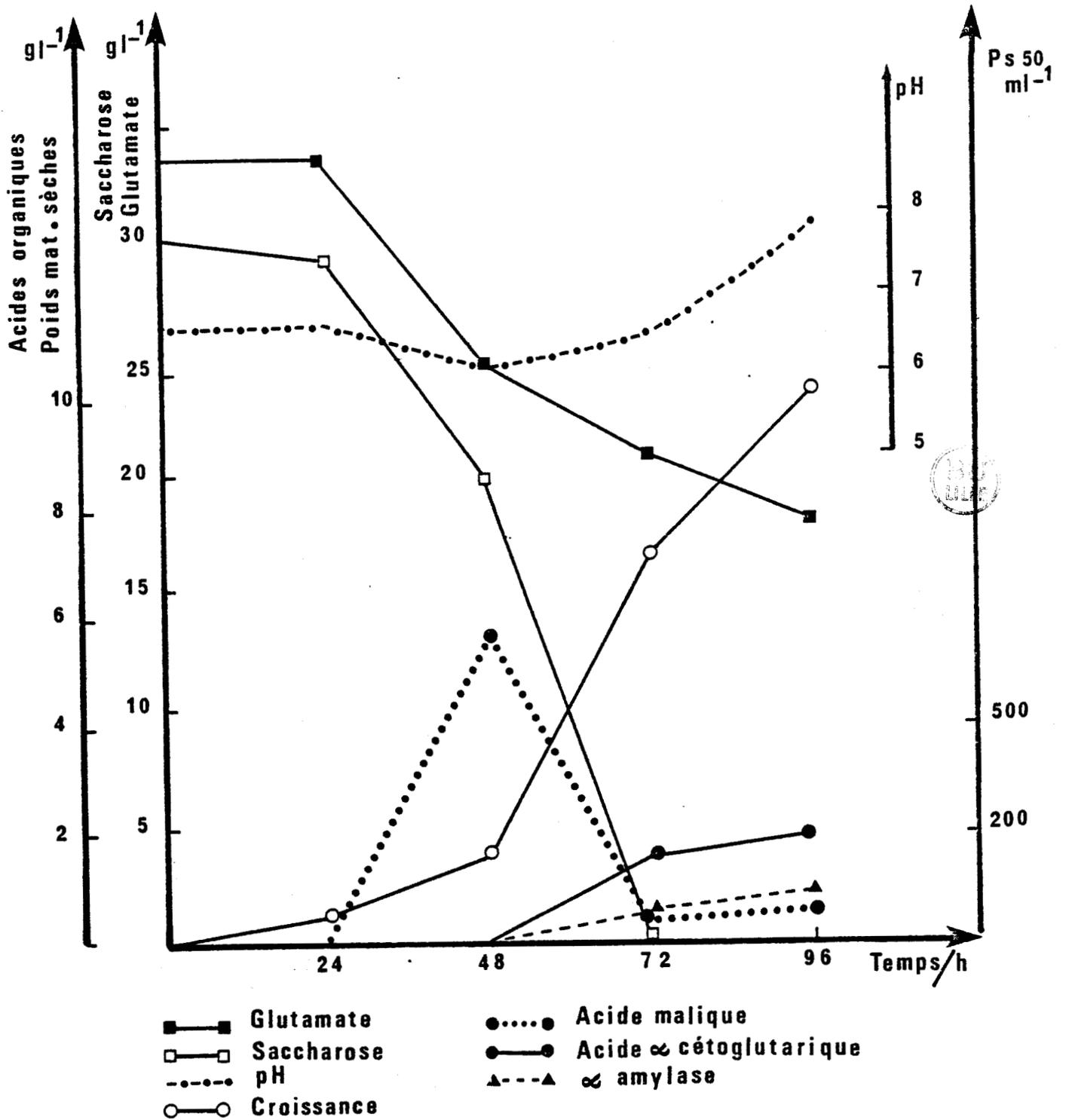


planche 11 : croissance, évolution du pH, synthèse d' α -amylase, production d'acides organiques et concentrations résiduelles en saccharose et glutamate de la souche 1135 cultivée sur saccharose.



En fonction de l'aptitude des souches BrBv IV et 1135 à synthétiser l' α -amylase les planches 8 à 11 nous permettent de classer les quatre substrats comme suit : maltose, saccharose, glucose et acétate de sodium.

D'autre part, la correction apportée au dosage de cette enzyme fait apparaître par rapport aux travaux de MALARD (1981) deux points intéressants :

- 1°) la synthèse d' α -amylase ne débute de façon significative qu'après 24 h,
- 2°) cette synthèse croît brutalement après 48 h de culture.

Si le premier point est observé chez les deux souches, seule la souche BrBv IV possède une synthèse d' α -amylase suffisante pour observer son accroissement après 48 heures, accroissement relevé sur tous les substrats inducteurs.

YABUKI et coll. (1977), à partir de résultats similaires, a émis l'hypothèse d'une induction de l' α -amylase en deux temps :

- 1°) l'inducteur pénètre à un taux très faible dans le mycélium grâce à une perméase constitutive ;
- 2°) ayant atteint une concentration intramycélienne suffisante, l'inducteur va favoriser d'une part la synthèse d'une perméase inductive et d'autre part le mécanisme de synthèse de l' α -amylase.

Ces résultats montrent également qu'il existe une relation entre la production d' α -amylase et l'accumulation d'acide malique.

Chez la souche BrBv IV cultivée sur maltose, où la concentration d'acide malique après 48h de culture n'est que de $0,32 \text{ gl}^{-1}$, nous obtenons après 96h de croissance mycélienne une production d' α -amylase de l'ordre de $1700 \text{ PS } 50 \text{ ml}^{-1}$; par contre, cultivée sur glucose, où la concentration d'acide accumulé est de $2,3 \text{ gl}^{-1}$, la production d' α -amylase tombe à $500 \text{ PS } 50 \text{ ml}^{-1}$. Il en est de même chez la souche 1135 où les concentrations d'acide malique constamment supérieures à 6 gl^{-1} sont associées à une production d' α -amylase toujours inférieure à $200 \text{ PS } 50 \text{ ml}^{-1}$. En reprenant l'hypothèse émise précédemment d'un rapport entre un métabolisme de type réducteur et l'excrétion des acides organiques, il apparaît que le métabolisme de la souche 1135 est constamment de ce type, alors que chez la souche BrBv IV son orientation est déterminée par la nature du substrat.

III - INFLUENCE DU GLUCOSE SUR L'ACCUMULATION DES ACIDES ORGANIQUES

Si le métabolisme de la souche 1135 est constamment de type réducteur, le métabolisme de la souche BrBv IV, par contre, semble orienté par la nature du substrat, comme en témoignent les faibles accumulations d'acides organiques de cette souche cultivée sur maltose en opposition aux rejets observés pendant la culture sur glucose et saccharose. Ceci nous a conduits à penser qu'il existait peut-être à la base de l'accumulation des acides organiques un composé commun aux deux souches. *A. oryzae* peut synthétiser nombre d'enzymes extracellulaires et parmi elles on relève la présence d' α -glucosidase et d'une invertase ; leur action respective sur le maltose et le saccharose entraîne la formation de glucose composé qui, nous l'avons vu planches 7 et 8, favorise l'accumulation des composés acides et, de plus, est connu pour son effet répresseur sur les voies oxydatives du cycle de Krebs (FLAVELL et WOODWAARD, 1970). La présence d'une invertase en quantité importante chez les souches BrBv IV et 1135 expliquerait alors leur métabolisme réducteur sur saccharose, de même qu'une α -glucosidase très présente chez la souche 1135 entraînerait ce type de comportement sur maltose. Chez BrBv IV cultivée sur maltose, une faible synthèse d' α -glucosidase permettrait le métabolisme oxydatif et, de ce fait, expliquerait les faibles rejets d'acides organiques observés sur ce milieu.

1 - DOSAGE DU GLUCOSE DANS LES MILIEUX DE CULTURE RESULTANT D'UNE HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU SUBSTRAT

Tableau 3 : Pourcentage de glucose libéré aux dépens du substrat à la suite des activités α -glucosidase et invertase produites par les souches BrBv IV et 1135.

Activité enzymatique	Substrat de départ	Souche cultivée	Temps de culture				
			0h	24h	48h	72h	96h
α -glucosidase	Maltose	BrBv IV	0,37 \pm 0,04	0,7 \pm 0,09	15 \pm 1,2	28 \pm 1,6	0,4 \pm 0,03
		1135	0,37 \pm 0,06	0,8 \pm 0,04	27 \pm 1,8	33 \pm 1,3	0,9 \pm 0,02
Invertase	Saccharose	BrBv IV	0,43 \pm 0,07	0,74 \pm 0,06	27 \pm 1,5	68 \pm 3,2	-
		1135	0,43 \pm 0,05	0,89 \pm 0,03	40 \pm 2,1	72 \pm 4,6	-

Les résultats exposés dans le tableau 3 montrent qu'à 48 h chez la souche 1135, 27% du maltose et 40% du saccharose ont été transformés en glucose ; chez la souche BrBv IV ce taux atteint 27% pour le saccharose et seulement 15% pour le maltose. Si ces résultats vont dans le sens d'un processus commun à l'accumulation des acides organiques ayant comme base le glucose, il faut cependant remarquer qu'à 72 heures avec un taux de glucose de 28%, la souche BrBv IV cultivée sur maltose ne présente aucune répression, ni dans la synthèse d' α -amylase, ni dans l'accumulation des acides organiques.

2 - RECHERCHE D'UN "EFFET GLUCOSE" RESPONSABLE DE L'ACCUMULATION DE L'ACIDE MALIQUE

Aussi, pour définir avec exactitude le rôle du glucose dans le comportement métabolique des souches 1135 et BrBv IV sur des composés dihydrosidiques, nous les avons cultivées sur milieu maltose pendant 48 h puis transférées après lavage sur un milieu de référence renfermant un rapport décroissant maltose/glucose. Après 1 et 2 h d'incubation, les concentrations d'acide malique accumulées par la souche 1135 cultivée sur les différents milieux sont très proches, ainsi que le montre le tableau 4.

Tableau 4 : Accumulation de l'acide malique après 1 et 2 heures d'incubation d'un mycélium des souches BrBv IV et 1135 sur un milieu de référence renfermant un rapport Maltose/Glucose décroissant.

Souche	Temps d'incubation	Rapport Maltose/Glucose				
		100 0	85 15	70 30	40 60	0 100
BrBv IV	1 heure	-	-	-	-	3,1 \pm 0,15
	2 heures	-	-	-	2,1 \pm 0,26	8,3 \pm 0,53
1135	1 heure	10,5 \pm 0,71	14 \pm 1,4	13,8 \pm 0,9	17,6 \pm 1,6	19,7 \pm 1,3
	2 heures	39,4 \pm 2,6	42 \pm 2,9	44,1 \pm 1,8	45,3 \pm 3,1	48 \pm 2,1

Résultats exprimés en $\mu\text{g ml}^{-1} \text{g}^{-1}$ de mycélium.

Or, les concentrations en glucose imputables à l' α -glucosidase ont été mesurées pour le milieu maltosé à 100% et ne sont que de 0,7% après 1 heure et 1,9% après 2 heures ; concentrations qui nous apparaissent trop faibles pour être responsables d'un comportement en tous points similaire à un milieu glucosé à 100%.

Ainsi, le comportement de type réducteur de la souche 1135 apparaît comme indépendant de la nature du substrat, alors que le métabolisme de la souche BrBv IV lui est étroitement lié. En effet, en présence d'un milieu glucosé à 100%, on décèle la présence de $8,3 \mu\text{gml}^{-1}\text{g}^{-1}$ de mycélium frais d'acide malique, alors qu'en milieu maltosé à 100% aucune accumulation n'est perceptible. Cependant, il est intéressant de noter que des concentrations de l'ordre de 15%, voire 30% de glucose par rapport au maltose n'entraînent pas d'accumulation décelable d'acide malique. Or, c'est en présence de telles concentrations de glucose que la souche BrBv IV cultivée sur maltose relargue l'acide malique.

Nous avons donc recherché quel pourrait être le facteur responsable de l'accumulation de l'acide malique chez la souche BrBv IV cultivée sur maltose. L'accumulation de l'acide α -cétooglutarique suivant un schéma similaire à l'acide malique nous a suggéré l'hypothèse d'un lien direct entre le glutamate initialement présent dans le milieu de culture et les acides relargués. Le glutamate assimilé au niveau du cycle de Krebs par l'intermédiaire de l' α -cétooglutarate pourrait favoriser l'accumulation de ce composé lui-même précurseur de l'acide malique via l'acide succinique et fumarique (acides retrouvés à l'état de trace dans les filtrats de culture). KINGMON et PATEMAN (1973) fournissent un premier élément en faveur de cette hypothèse. Ils démontrent en effet que, chez *A. nidulans*, la glutamate-déshydrogénase NAD⁺ dépendante chargée d'oxyder le glutamate en α -cétooglutarate est sujette à la répression catabolique ; son activité ira donc croissante en fin de culture.

Le second élément est fourni par l'observation des planches 8 à 11, où l'accumulation de l'acide malique dans les conditions défavorables à la synthèse d' α -amylase peut être décomposée en trois phases :

- 1°) une phase de forte accumulation avec un maximum à 48 heures ;
- 2°) une phase d'assimilation : passé un certain seuil de concentration résiduelle de substrat, il semble que l'acide accumulé est réutilisé et devient alors le principal substrat énergétique capable d'alimenter le cycle citrique. FAYRET (1975) a montré sur *Gnomonia leptostyla* un schéma évolutif similaire ;
- 3°) une nouvelle phase d'accumulation, mais d'amplitude très faible.

Cette dernière phase associée à la production croissante d'acide α -cétoglutarique suggère que l'accumulation de l'acide malique résulte, tant chez la souche BrBv IV que chez la souche 1135, de deux processus distincts.

Le premier processus impliquant le glutamate ne serait pleinement apparent que chez la souche BrBv IV cultivée sur maltose. Dans les autres conditions de culture, il serait masqué pendant les premières 72 h par l'accumulation importante d'acide malique résultant d'un second mécanisme. Second mécanisme qui pourrait être expliqué :

- soit par une carboxylation de composés produits par la glycolyse. TACHIBANA et MURAKAMI (1974) ont montré qu'un rejet important de malate dans les filtrats de culture de *Schizophyllum commune* était la conséquence de la carboxylation de composés en C3 issus de la voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas ;
- soit par une activité importante du cycle glyoxylique. TURIAN (1960a et b) observe avec *N. crassa* une accumulation plus abondante d'acide malique dans les cultures dotées de la plus forte activité isocitratase, enzyme-clef de ce cycle.

IV - INFLUENCE DE L'ACETATE DE SODIUM SUR LA PHYSIOLOGIE DE LA BIOSYNTHESE DE L' α -AMYLASE

1 - INFLUENCE DE L'ACÉTATE COMME SEULE SOURCE DE CARBONE

Pour déterminer la valeur de cette seconde hypothèse, nous avons cultivé les deux souches sur acétate de sodium, substrat connu pour son action positive sur les voies réductrices (O'CONNELL, 1980 ; KORNBERG, 1966) (planche n° 5). Cependant nous n'avons pu déceler la présence dans les filtrats de culture d'acides organiques. Remarquons néanmoins qu'un tel substrat est loin de favoriser la croissance puisque celle-ci, après 96 heures, n'atteint pour la souche BrBv IV que 5,6 g/l de matière sèche alors que la souche 1135 n'atteint elle que 4,9 g/l, le pH des milieux de culture, malgré l'apport d'acétate sous forme acide, atteignant très vite des valeurs supérieures à 7, zone qui selon VALLIER (1977) favorise la lyse mycélienne.

2- INFLUENCE DU MALTOSE SUPPLÉMENTÉ D'ACÉTATE DE SODIUM

Une approche différente de ce problème a été tentée en ajoutant au milieu maltosé 30% d'acétate de sodium (planches 12 et 13). Chez les souches BrBv IV et 1135, cette adjonction d'acétate de sodium entraîne une perte de production d' α -amylase sans toutefois augmenter corrélativement la production d'acide malique à 48 heures ; par contre à 96 heures cette accumulation par rapport au milieu maltosé témoin s'est révélée légèrement plus élevée. L'accumulation d'acide α -cétoglutarique quant à elle n'a pas subi de changement significatif.

Pour TURIAN (1963), l'assimilation de l'acétate exogène implique une compétition intracellulaire pour le coenzyme A qui serait en défaveur de l' α -cétoglutarique déshydrogénase ; le blocage de cette enzyme, faute de coenzyme A, entraînerait une accumulation de l'acide α -cétoglutarique résultant de l'activité isocitrate déshydrogénase. Une telle accumulation aurait pour conséquence la rétroinhibition de cette enzyme, favorisant ainsi une concentration de l'isocitrate, composé inducteur de l'activité isocitrasique.

L'absence de toute accumulation supplémentaire d'acide α -cétoglutarique chez BrBv IV et 1135 cultivées sur maltose complétement par de l'acétate de sodium par rapport au milieu maltosé seul, nous a conduits à penser que l'action de l'acétate sur l' α -cétoglutarate déshydrogénase pouvait être masquée par une déficience naturelle de cette enzyme chez les deux souches. L'accumulation d'acide α -cétoglutarique observée dans toutes nos conditions culturales serait donc une conséquence directe de cette déficience. Une telle hypothèse interdirait alors le mécanisme d'accumulation d'acide malique évoqué précédemment mettant en jeu la désamination du glutamate suivie d'une décarboxylation de l' α -cétoglutarate en acide succinique ; auquel cas l'assimilation du glutamate pourrait notamment s'effectuer *via* l'isocitrate déshydrogénase, OCHOA (1948) ayant démontré que cette enzyme était réversible, donc capable de carboxyler l' α -cétoglutarate en isocitrate.

Cette hypothèse met à nouveau en lumière le rôle que pourrait jouer le glutamate dans l'accumulation α -cétoglutarique, au niveau des voies annexes au cycle de Krebs, deux enzymes sont capables de prendre en charge ce composé ; il s'agit de la glutamate oxaloacétate transaminase et de la glutamate déshydrogénase NADP+.

Planche 12 : Croissance, évolution du pH, synthèse d' α amylase, production d'acides organiques et concentrations résiduelles en maltose de la souche BrBv IV cultivée sur milieu maltose supplémenté à 30% d'acétate de sodium.

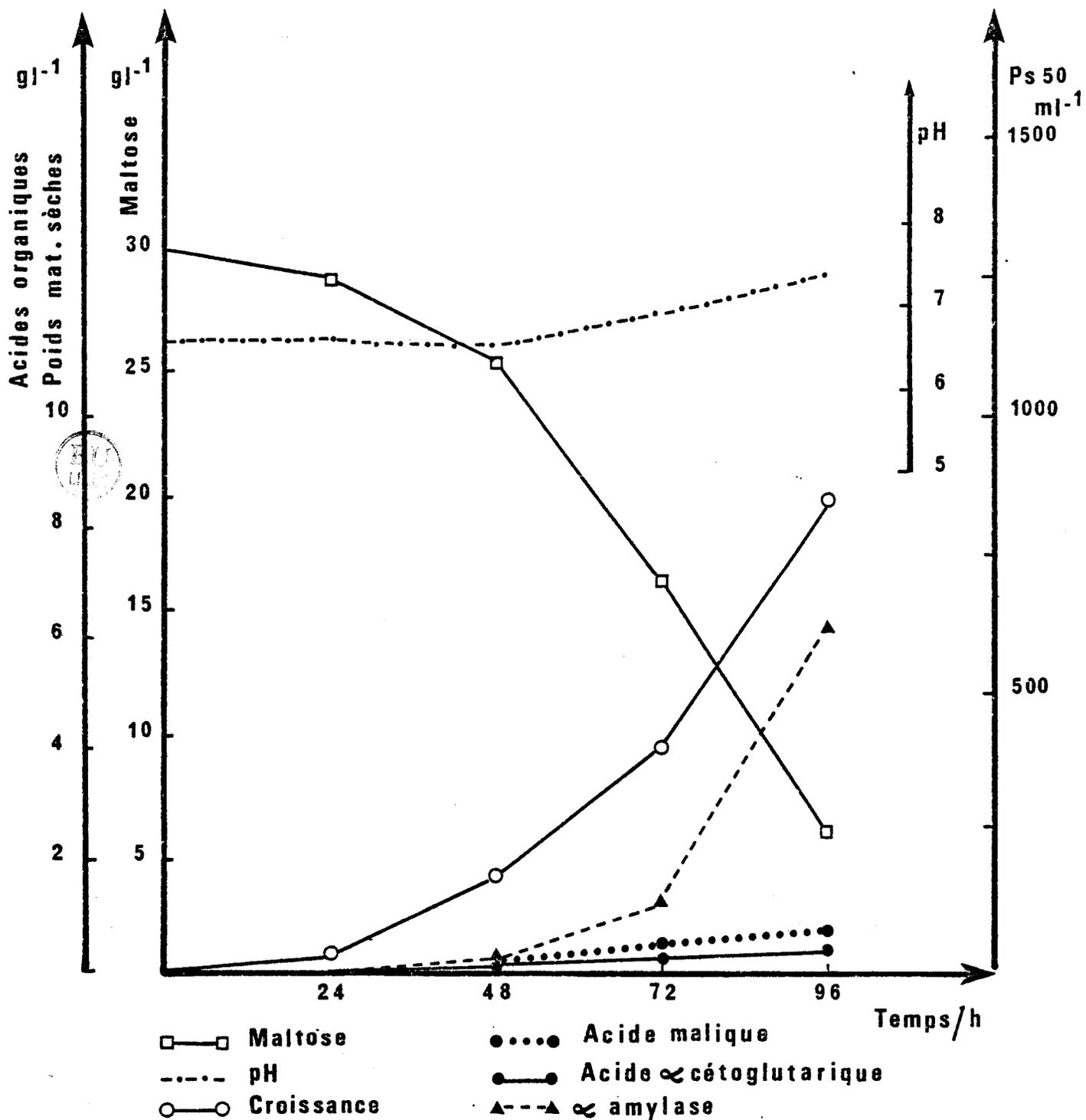
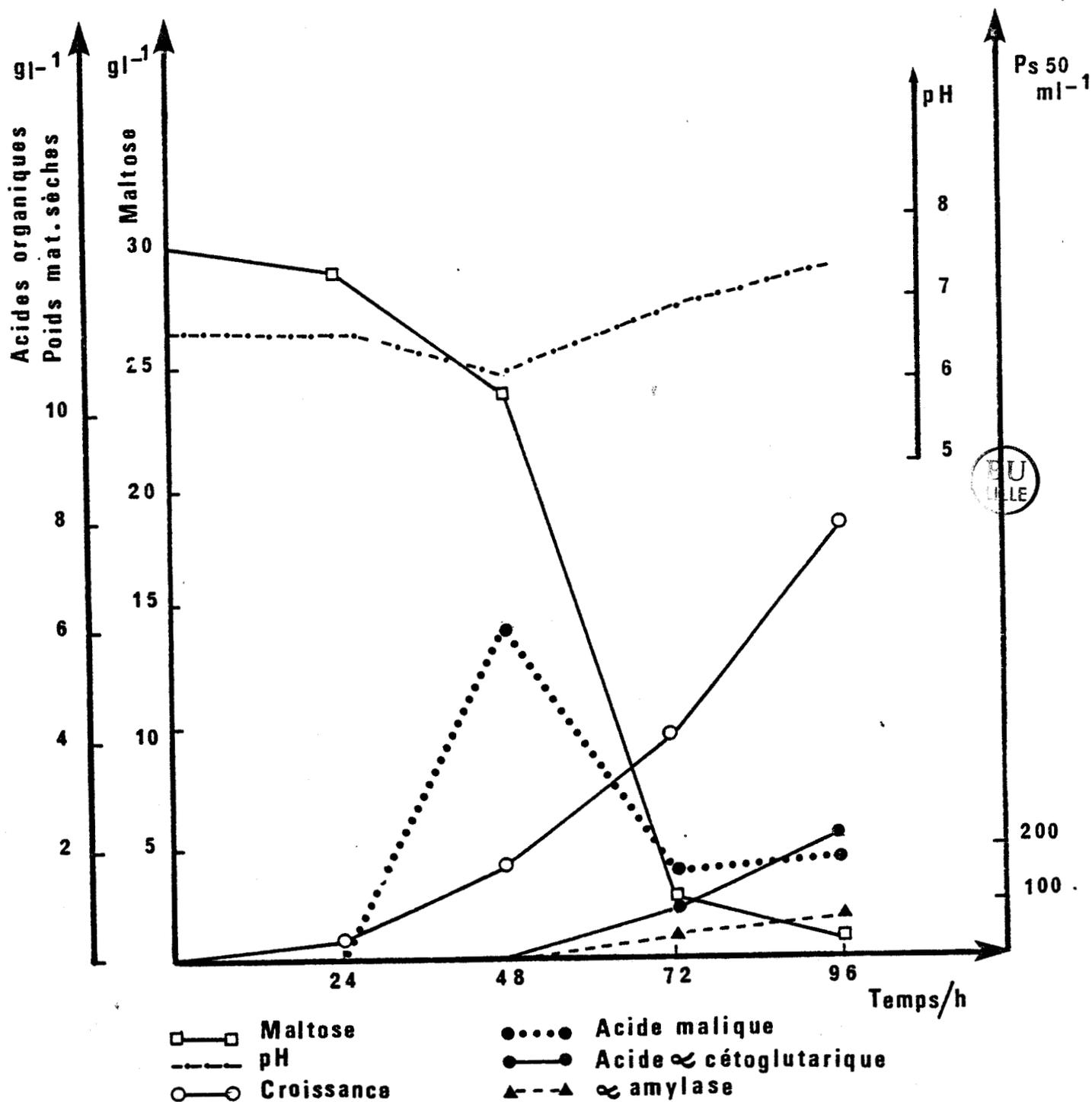


Planche 13 : Croissance, évolution du pH, synthèse d' α -amylase, production d'acides organiques et concentrations résiduelles en maltose de la souche 1135 cultivée sur milieu maltose supplémenté à 30% d'acétate de sodium.



V - INFLUENCE D'UNE SOURCE D'AZOTE MINERALE SUR L'ACCUMULATION DES ACIDES ORGANIQUES DANS LES FILTRATS DE CULTURE

Le glutamate entrant dans les milieux de culture à une concentration particulièrement élevée comme source d'azote, nous avons pensé qu'il pouvait favoriser l'accumulation d'acide α -cétoglutarique, d'une part en rétro-inhibant l'activité glutamate déshydrogénase NADP⁺ et d'autre part comme substrat de la glutamate oxaloacétate transaminase et de la glutamate déshydrogénase NAD⁺. Pour étudier son rôle précis dans l'accumulation des acides organiques dans les filtrats de culture, nous l'avons remplacé par une source d'azote minéral à savoir $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ et $\text{NH}_4 \text{NO}_3$, tous deux présents à raison de 5 g l⁻¹

Le tableau 5 indique sans conteste le rôle joué par le glutamate dans l'accumulation de l'acide α -cétoglutarique.

En effet, alors qu'en présence de glutamate on enregistre respectivement pour la souche BrBv IV et la souche 1135 l'accumulation à 96 heures de 48 μg et de 269 μg d'acide α -cétoglutarique, en présence d'une source d'azote minérale cette accumulation tombe toujours, pour les souches BrBv IV et 1135, à 4,1 μg et 17 μg d'acide α -cétoglutarique, soit dans les deux cas une perte de l'ordre de 90% par rapport à la source d'azote organique.

De plus, l'accumulation d'acide glutamique en présence d'une source d'azote minérale renforce l'hypothèse du rôle majeur joué par le glutamate exogène sur l'équilibre glutamate \rightleftharpoons α -cétoglutarate.

D'autre part, si les concentrations en acide malique accumulées par la souche 1135 dans les 72 premières heures de culture varient peu, à 96 heures par contre, elles accusent une légère baisse qui laisserait à penser que la désamination du glutamate participe chez cette souche à l'accumulation de l'acide malique. Chez BrBv IV, ce rôle semblerait plus prépondérant puisqu'en présence d'une source d'azote minérale on enregistre dès 48 heures une chute dans les concentrations d'acide α -cétoglutarique accumulé. Il reste néanmoins qu'en fonction des concentrations similaires en acide malique présentes chez la souche 1135 cultivée pendant 48 heures en présence d'une source d'azote minérale ou organique, la désamination du glutamate ne peut jouer qu'un rôle secondaire dans l'accumulation massive de cet acide.

Tableau 5 : Influence de la source d'azote sur l'accumulation des acides organiques chez les souches BrBv IV et 1135 cultivées sur milieu maltose.

Acide accumulé	Souche	Source d'azote	Temps de culture			
			24h.	48h	72h	96h
Acide malique	BrBv IV	Glutamate	-	72 ± 4,7	238 ± 18,9	291 ± 19,7
		(NH ₄) ₂ HPO ₄ , NH ₄ NO ₃	-	-	70 ± 5,2	100 ± 8,1
	1135	Glutamate	-	3320 ± 91,6	400 ± 21,5	221 ± 6,1
		(NH ₄) ₂ HPO ₄ , NH ₄ NO ₃	-	3015 ± 78,2	450 ± 13,1	109 ± 2,6
Acide α-cétoglutarique	BrBv IV	Glutamate	-	-	28 ± 1,6	48 ± 2,4
		(NH ₄) ₂ HPO ₄ , NH ₄ NO ₃	-	-	-	4,1 ± 0,3
	1135	Glutamate	-	41 ± 1,5	178 ± 12,9	269 ± 14,8
		(NH ₄) ₂ HPO ₄ , NH ₄ NO ₃	-	-	35 ± 1,3	17 ± 0,8
Acide glutamique	BrBv IV	(NH ₄) ₂ HPO ₄ , NH ₄ NO ₃	-	-	79 ± 1,7	179 ± 16,7
	1135	(NH ₄) ₂ HPO ₄ , NH ₄ NO ₃	-	82 ± 2,1	137 ± 13,6	291 ± 11,8

Résultats exprimés en µg d'acides organiques µg⁻¹ mycélium (poids sec) ml⁻¹ filtrat.

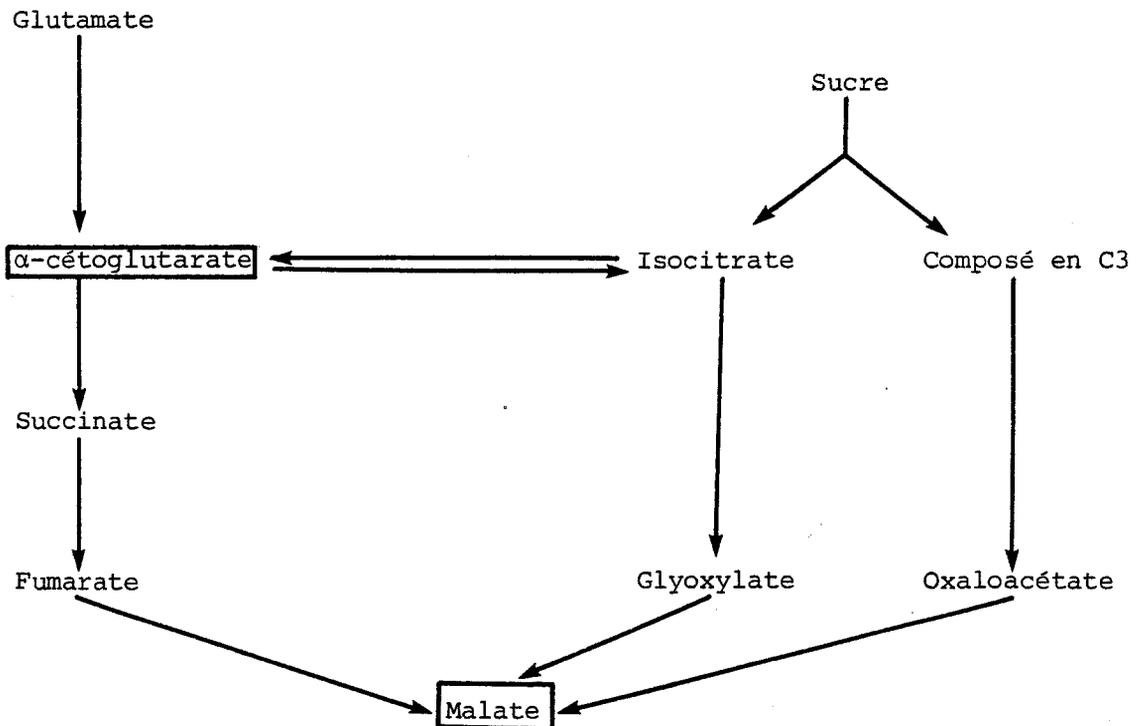


VI - CONCLUSION

Les études chromatographique et enzymatique entreprises sur les filtrats de culture nous ont permis d'identifier l'acide malique comme composé responsable de l'acidification des milieux de culture à 48 heures. Associé à cet acide, nous avons décelé la présence d'acide α -cétoglutarique, dont le maximum de production se situe à 96 heures.

La souche BrBv IV est apparue comme la moins productive de ces acides avec toutefois une accumulation plus marquée sur glucose et saccharose ; la souche 1135 quant à elle acidifie fortement tous les milieux de culture. Le métabolisme de la souche BrBv IV, à l'encontre de la souche 1135, apparaît comme dépendant du substrat ; une répression catabolique imposée par le glucose n'est pas à écarter, bien que nous n'ayons pu démontrer la validité d'une telle hypothèse chez BrBv IV cultivée sur maltose.

Nos résultats nous ont permis d'émettre plusieurs hypothèses répondant à l'accumulation de l'acide malique et de l'acide α -cétoglutarique, hypothèses présentées dans le schéma ci-dessous.

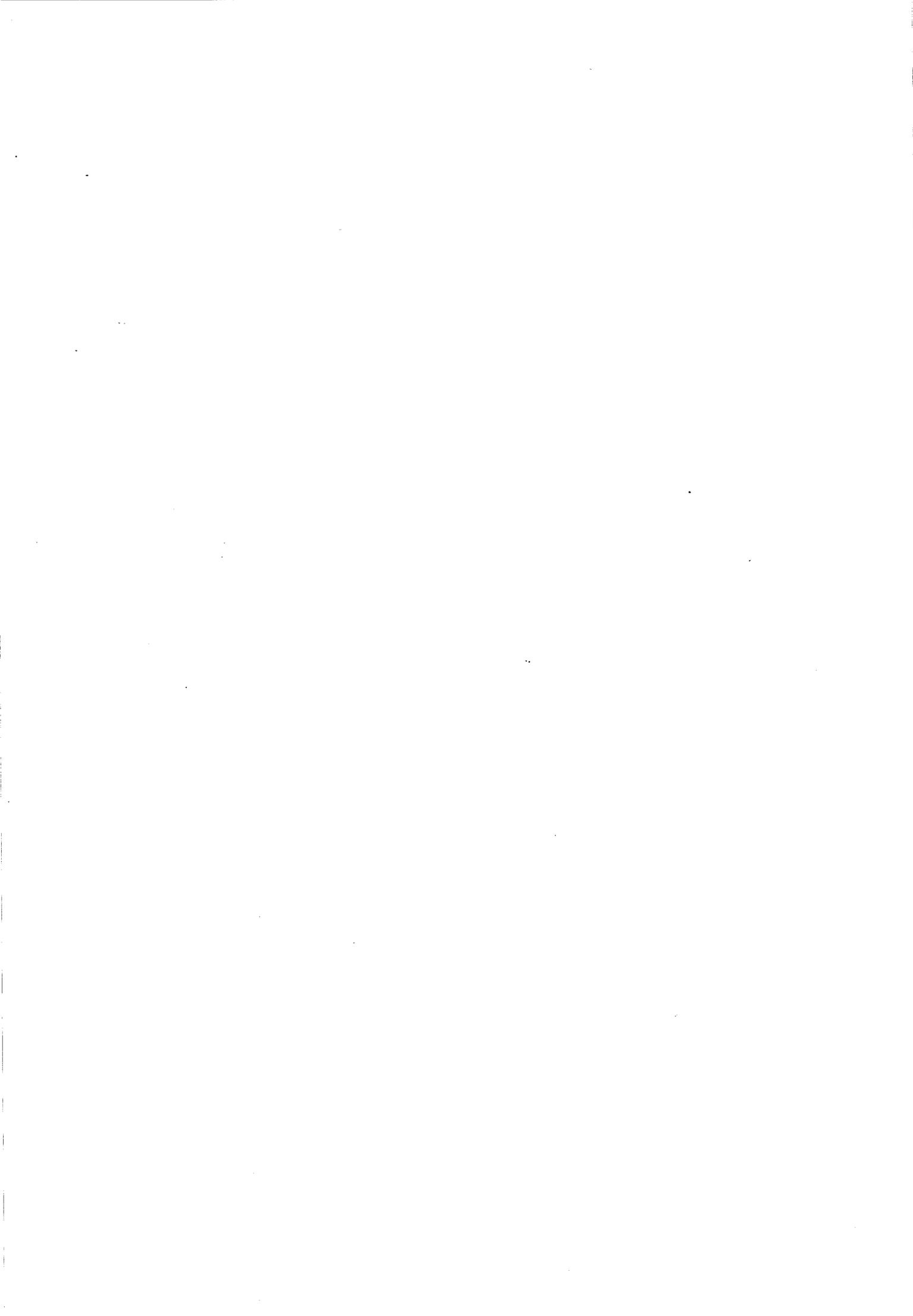


Le glutamate de sodium présent dans les milieux de culture à de fortes concentrations pourrait être à l'origine de l'accumulation de l'acide α -cétoglutarique, d'une part en tant que substrat de la glutamate déshydrogénase NAD^+ et de la glutamate oxalo-transaminase, et d'autre part en tant que répres-seur de la glutamate déshydrogénase NADP^+ dépendante.

Il semblerait que ce composé joue également un rôle dans l'ac-cumulation de l'acide malique, bien que les voies métaboliques impliquées restent à définir.

Nos résultats laissent en effet entrevoir une possibilité de défaillance de l'activité α -cétoglutarate déshydrogénase, auquel cas l' α -cétog-lutarate pourrait être carboxylé en isocitrate et ainsi participer à l'accumu-lation de l'acide malique *via* le shunt glyoxylique. Il semble cependant que cette voie reste minoritaire dans l'accumulation de l'acide malique. Une par-ticipation du shunt glyoxylique à l'accumulation massive d'acide malique observée après 48 h de culture n'est toutefois pas à écarter. L'isocitrate issu des composés glycolytiques empruntant le cycle de Krebs pourrait être en effet pris en charge par l'isocitratase, hypothèse d'autant plus plausible dans le cas d'une défaillance de l' α -cétoglutarate déshydrogénase. Une carbo-xylation d'un composé en C3 issu de la glycolyse suivi de sa réduction en malate reste également une possibilité qu'il nous faudra envisager.

Aussi, pour déterminer quelles sont les voies métaboliques impliquées dans l'accumulation des acides organiques dans les milieux de cul-ture et leurs éventuels liens avec la production d' α -amylase, nous nous sommes penchés plus avant dans l'étude du métabolisme intermédiaire et plus particu-lièrement dans l'étude de ces enzymes clefs.



CHAPITRE II

CARACTÉRISATION DES VOIES MÉTABOLIQUES RESPONSABLES DE L'ACCUMULATION DES ACIDES ORGANIQUES

INTRODUCTION

La conduite de ce travail a été dictée par les résultats obtenus dans le chapitre précédent. Nous avons envisagé successivement :

1°) l'étude de la glycolyse

L'identification des composés acides dans les filtrats de culture n'ayant pas révélé la présence d'acide gluconique ou 2-cétogluconique, nous limiterons cette étude de la glycolyse à la voie des hexoses monophosphates et à la voie d'Emden-Meyerhof.

- *Voie des hexoses monophosphates*

Cette voie comporte des réactions non oxydatives comme la *transcétolase* ou la *transaldolase* extrêmement difficile à saisir ; c'est pourquoi notre attention s'est portée sur les deux premières enzymes spécifiques de cette voie :

- *glucose - 6 - P - déshydrogénase*
- *6 - P - gluconate déshydrogénase*

- *Voie d'Emden-Meyerhof*

La plupart des enzymes de la voie d'Emden-Meyerhof sont communes à la chaîne des hexoses monophosphates ; seule la *phosphofructokinase* peut être considérée comme spécifique à la voie d'Emden-Meyerhof. Mais en raison des difficultés rencontrées lors des premiers essais sur cette enzyme, nous avons étudié l'activité de la *fructose diphosphate aldolase* qui, sans être une enzyme à part entière de cette chaîne, n'en reflète pas moins son activité.

2°) l'étude du cycle de Krebs et du cycle glyoxylique

Nous déterminerons le rapport des activités du cycle de Krebs et du cycle glyoxylique. Ce dernier étant soupçonné d'être à l'origine de l'accumulation de l'acide malique dans les filtrats de culture, il est important de savoir si, *in vitro*, ce cycle a un potentiel enzymatique suffisant pour supporter une telle hypothèse.

Pour ce faire, nous étudierons successivement l'*isocitratase* et l'*isocitrate déshydrogénase* dont deux formes ont été isolées :

- une forme NADP+ dépendante
- une forme NAD+ dépendante.

Au sujet de cet équilibre *isocitrate déshydrogénase/isocitratase*, rappelons que TURIAN (1970), SMITH et GALBRAITH (1971) ont démontré son importance dans les différenciations fongiques. La question posée est de savoir si un tel équilibre peut avoir des implications dans la physiologie de la production de l' α -amylase chez *A. oryzae*.

Les premiers éléments de réponse fournis par les travaux sur ces deux enzymes seront complétés par l'étude de la *malate synthétase* qui, avec l'*isocitratase*, forme le cycle glyoxylique (KORNBERG, 1957). Celui-ci, outre une molécule de malate, fournit une molécule de succinate dont nous envisagerons la transformation en acide malique au niveau du cycle de Krebs par l'étude de la *succino-déshydrogénase* et de la *fumarase*.

L'accumulation de cet acide dans les milieux de culture suggère la possibilité d'une déficience au niveau de la *malate déshydrogénase* ; nous porterons donc un intérêt tout particulier à l'étude de cette enzyme. Si dans la physiologie de l'accumulation des acides organiques nous n'avons pas recueilli d'éléments pouvant appuyer l'hypothèse d'une telle déficience, par contre nous avons quelques raisons de penser que l'activité α -cétoglutarate *déshydrogénase* chez les deux souches est constamment inhibée, voire même totalement absente. Nous tenterons de confirmer cette hypothèse, puis nous préciserons le rôle joué par la *glutamate déshydrogénase* NAD+ et NADP+ dépendante dans l'accumulation de l'acide α -cétoglutarique d'une part, et de l'acide malique d'autre part.

3°) l'étude des échanges gazeux

Nous étudierons ensuite les échanges gazeux de ces deux souches et les interactions de ceux-ci sur l'accumulation des acides organiques.

Forts de ces résultats, nous tenterons une approche des mécanismes responsables de cette accumulation chez les souches BrBv IV et 1135. Le lecteur trouvera en annexe les protocoles d'extraction et de dosage des enzymes intramycéliennes. Nous rappellerons ici que les planches présentées tout au long de ce chapitre reflètent l'évolution des activités spécifiques enzymatiques relevées sur des broyats mycéliens des deux souches cultivées sur quatre substrats, et ce pendant 24, 48, 72 et 96 heures.

Pour faciliter l'interprétation des résultats, nous avons choisi quatre substrats de structures simples ; plus tard nous élargirons nos conclusions aux polysides utilisés dans l'industrie.

Ces quatre substrats ont déjà fait l'objet d'une étude *in vivo* dans le premier chapitre et sont :

- le maltose, qui induit chez la souche BrBv IV une forte synthèse d' α -amylase associée à une faible accumulation d'acides organiques, et qui induit chez 1135 une réponse totalement opposée ;
- le glucose, substrat peu inducteur de la synthèse d' α -amylase et responsable d'une acidification des milieux de culture, tant chez la souche BrBv IV que chez la souche 1135 ;
- le saccharose, substrat en C12 comme le maltose mais qui, de par sa configuration en α -glucosyl-fructose, n'induit que très faiblement la synthèse d' α -amylase et, de plus, est responsable d'une acidification similaire à celle imposée par le glucose ;
- l'acétate de sodium : il nous a paru intéressant, malgré les faibles réponses observées chez les deux souches cultivées sur un tel substrat, d'étudier le comportement métabolique des souches 1135 et BrBv IV, face à un substrat en C2.

Planche 14 : Evolution de l'activité enzymatique de l'aldolase, de la glucose-6-P-déshydrogénase ———, de la 6-P-gluconate déshydrogénase — — — — et du rapport des activités glucose-6-P-déshydrogénase/aldolase — — — — relevée sur des broyats mycéliens de la souche BrBv IV cultivée sur maltose, glucose, saccharose et acétate de sodium.

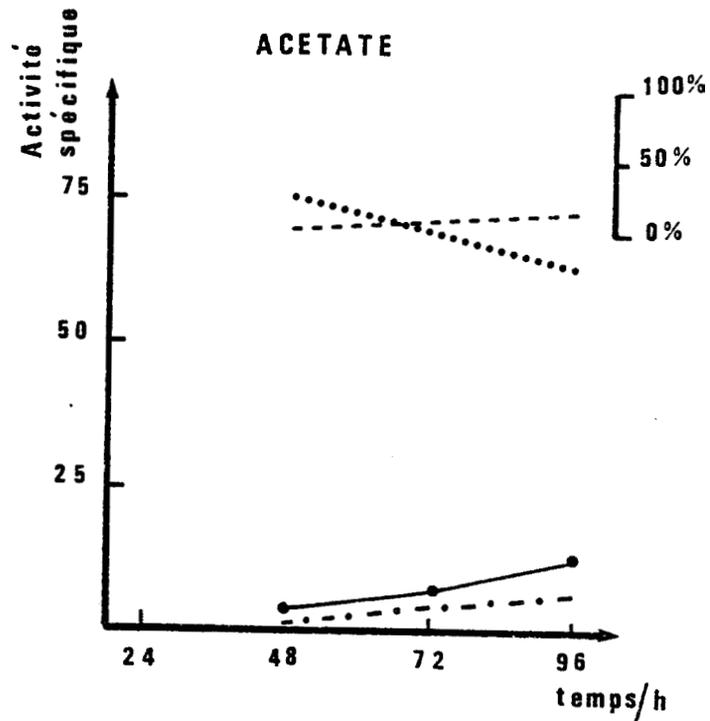
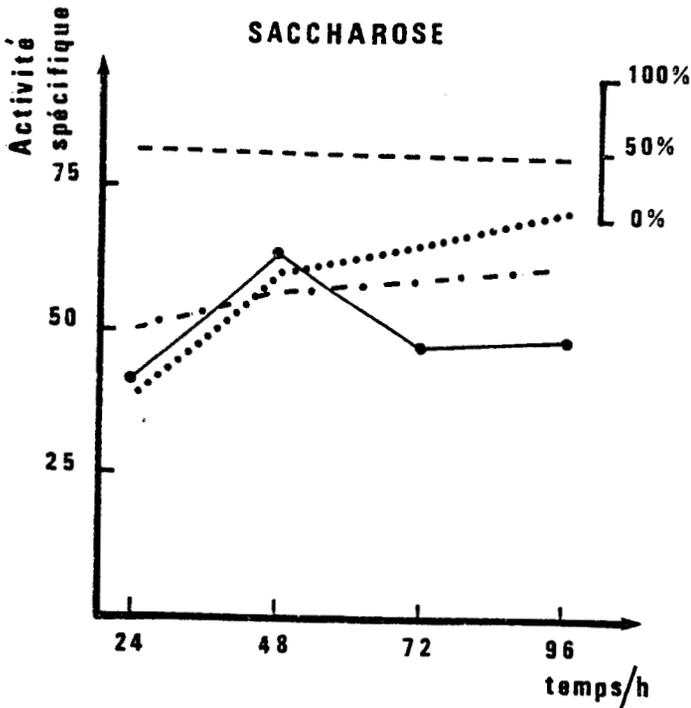
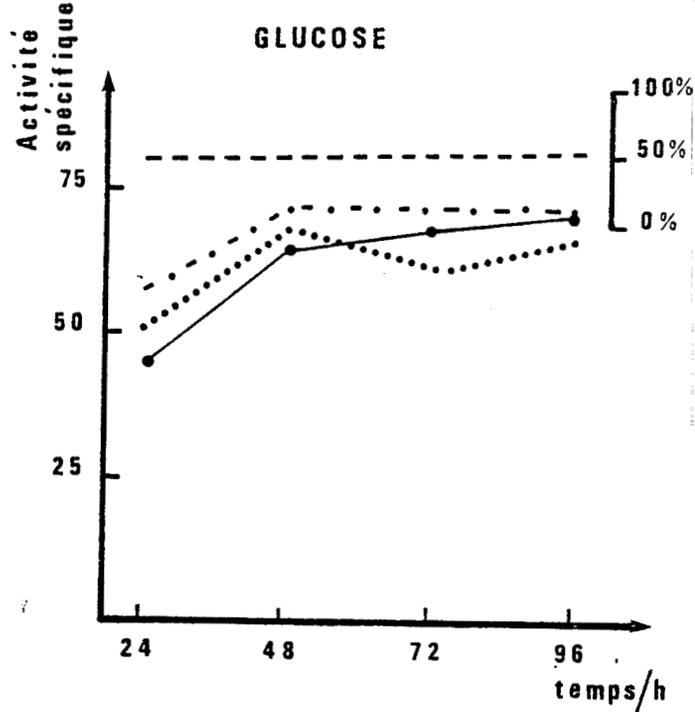
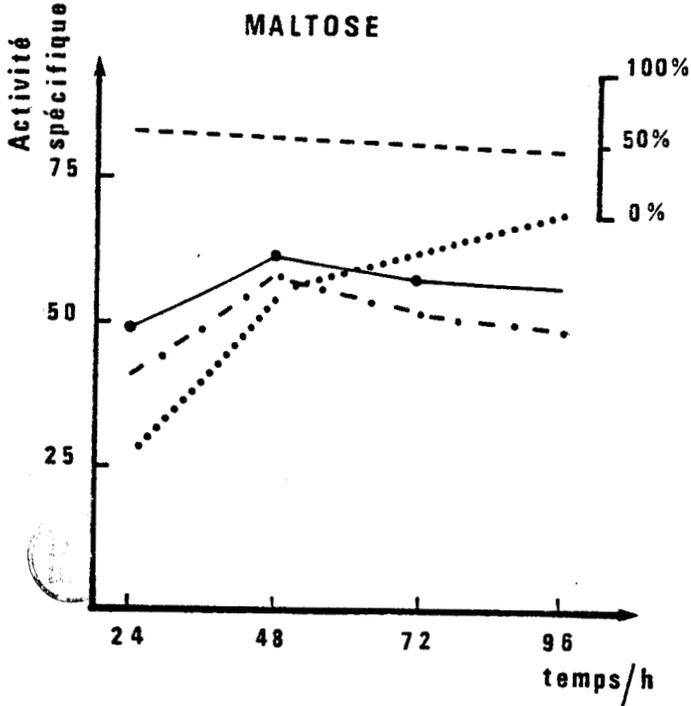
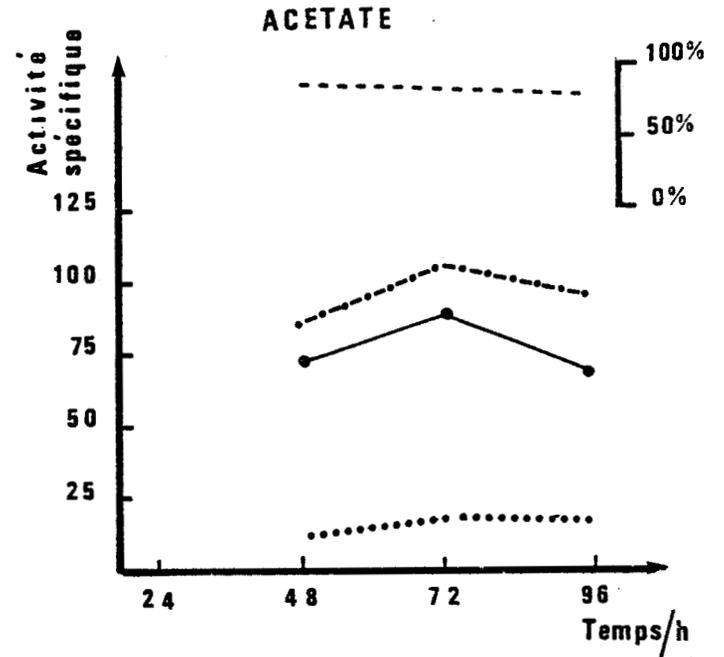
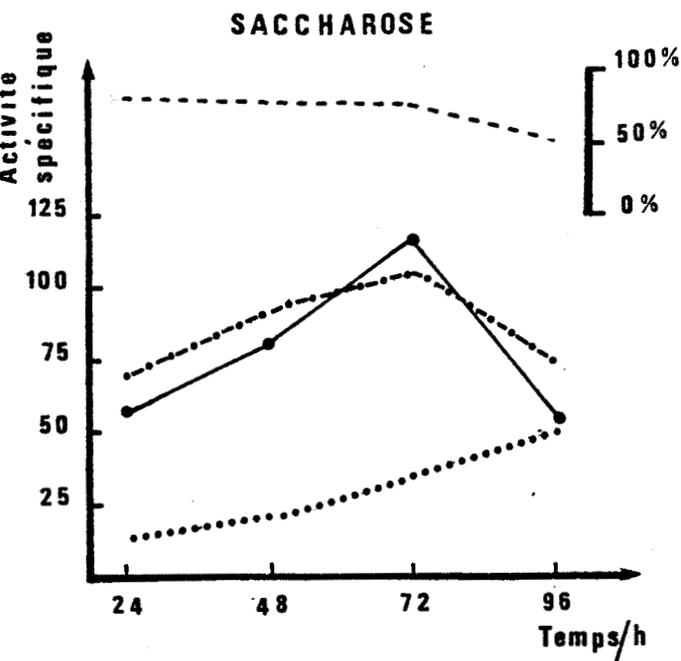
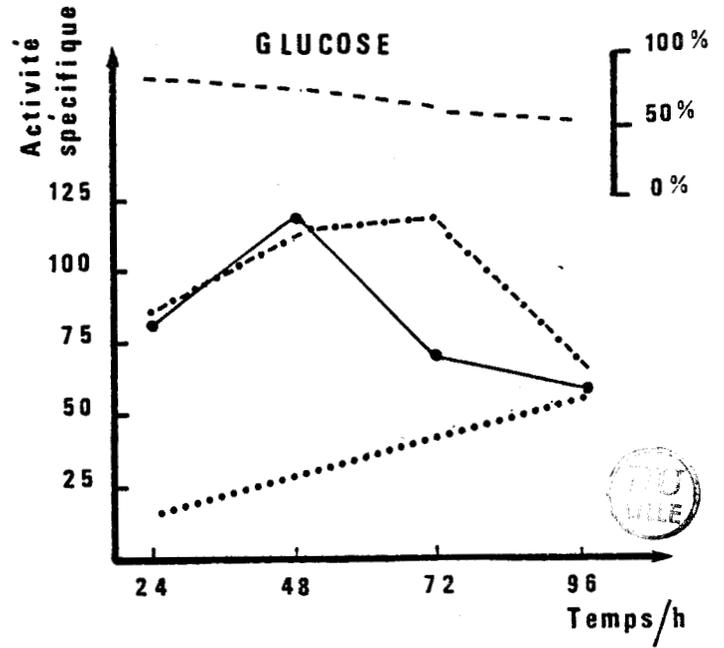
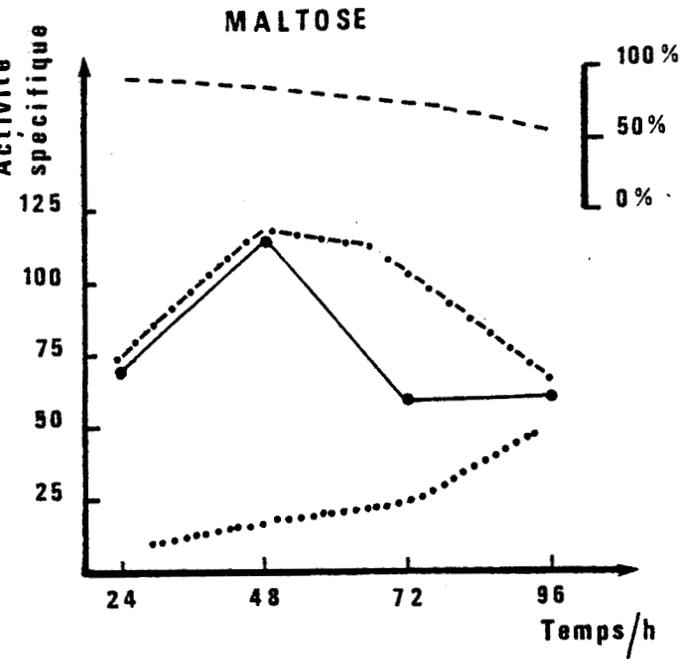


Planche 15 : Evolution de l'activité enzymatique de l'aldolase , de la glucose 6-P-déshydrogénase ——— , de la 6-P-gluconate déshydrogénase — . — et du rapport des activités glucose-6-P-déshydrogénase/aldolase - - - - - relevée sur des broyats mycéliens de la souche 1135 cultivée sur maltose, glucose, saccharose et acétate de sodium.



I - ACTIVITES GLYCOLYTIQUES

Bien qu'HORECKER (1962) démontre la présence chez *A. oryzae* d'une glucose-6-P déshydrogénase, d'une 6-P-gluconate déshydrogénase NAD⁺ dépendante, les souches 1135 et BrBv IV semblent ne présenter qu'une forme NADP⁺ dépendante.

Des résultats exposés dans les planches 14 et 15, il ressort que chez la souche 1135 le glucose-6-P formé à partir de substrats comme le glucose, maltose ou saccharose est métabolisé majoritairement par la voie des hexoses monophosphates, alors que chez BrBv IV l'activité des voies hexoses monophosphates (HMP) et Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) est équilibrée. De fait si la littérature nous offre couramment un équilibre EMP/HMP proche de 50% (BLUMENTHAL 1965, NEWBURGH et CHELDELIN 1958), elle ne mentionne pas d'équilibre orienté à 90% vers la chaîne HMP comme semble l'être le métabolisme de la souche 1135. Sans une étude radiochimique préalable de la glycolyse, nous ne pouvons préjuger des rapports *in vivo* existant entre les deux chaînes ; il faut cependant remarquer que, dans les premières 48 heures de croissance, la somme des activités glucose-6-P-déshydrogénase et adolase est relativement proche chez les deux souches. L'activité glucose-6-P-déshydrogénase étant prédominante chez la souche 1135, il est permis de penser qu'*in vivo* une inhibition importante de la chaîne HMP entraînerait des répercussions importantes sur l'assimilation du substrat, ce qui paraît incompatible avec les consommations plus élevées de substrat relevées chez la souche 1135 par rapport à la souche BrBv IV.

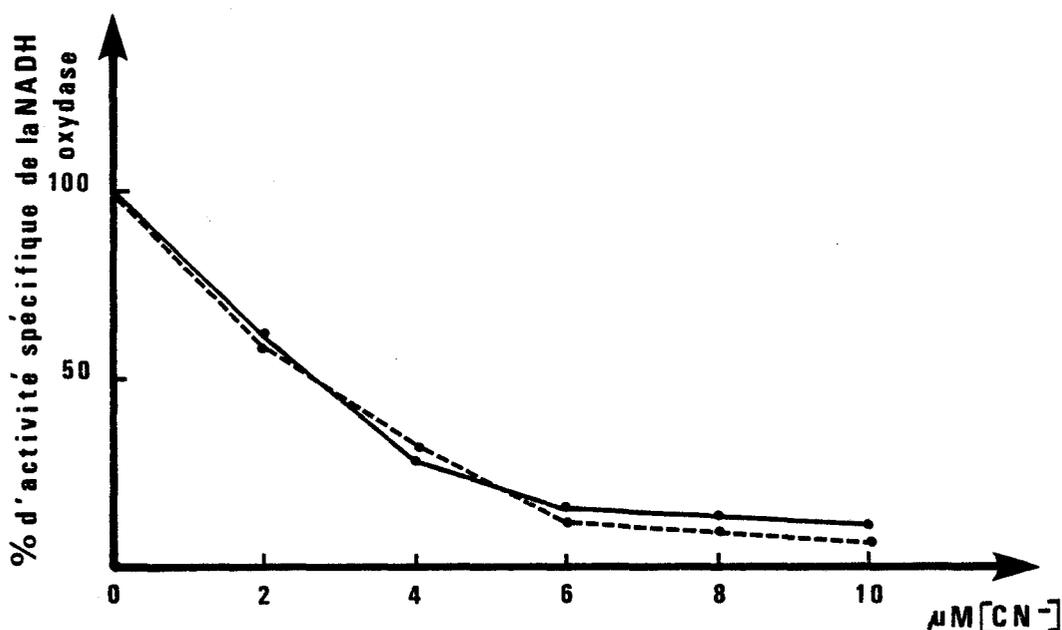
Les particularités métaboliques enregistrées *in vivo* doivent donc correspondre à un besoin physiologique différent pour les deux souches. NG et coll. (1972) observent que les plus hautes activités de la chaîne HMP sont généralement associées à une forte demande biosynthétique en NADPH ; ainsi, SMITH et GALBRAITH (1971) montrent que la chaîne HMP est plus active durant la phase exponentielle que durant la phase stationnaire. Cependant, sur maltose en phase exponentielle, l'activité maximale de la glucose-6-P déshydrogénase est chez BrBv IV de $62 \mu\text{M mn}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de protéines ; chez 1135, dont la vitesse de croissance est moindre, cette activité est de $114 \mu\text{M}$. On peut donc se demander dans quelle mesure la chaîne des hexoses monophosphates chez la souche 1135 n'a pas également une fonction énergétique importante.

II - ACTIVITES DU CYCLE DE KREBS ET DU CYCLE GLYOXYLIQUE

I - ACTIVITE ISOCITRATE DÉSHYDROGÉNASE NADP⁺ ET NAD⁺ DÉPENDANTE ET ISOCITRATASE

Concernant l'étude de l'isocitrate déshydrogénase, les résultats des planches 16 et 17 font apparaître une prédominance de l'activité isocitrate déshydrogénase NADP⁺ par rapport à la forme NAD⁺ dépendante. Chez BrBv IV, cette activité est pratiquement nulle pendant les premières heures de croissance. La raison de ces faibles activités est due en partie à la présence dans les broyats de culture d'activité NADH oxydase. Parmi les inhibiteurs utilisés pour éviter la réoxydation de l'*NADH*, l'ion CN⁻ s'est révélé donner les meilleurs résultats, bien que son action inhibitrice se situe au niveau des cytochromes.

Figure 2 : Action des ions CN⁻ sur l'activité de l'isocitrate déshydrogénase NAD⁺ dépendante chez les souches BrBv IV — et 1135. - - -



Les résultats des planches 16 et 17 ont été enregistrés en présence de 5 μM de KCN, concentration où l'activité NADH oxydase est inhibée à 80%. De ce fait, l'action de cette enzyme n'étant pas la raison majeure des faibles activités isocitrate déshydrogénase NADH dépendante, celles-ci pourraient être liées à l'instabilité de cette enzyme, bien que nous n'ayons pas trouvé d'agent protecteur capable d'étayer cette hypothèse.

Planche 16 : Evolution de l'activité enzymatique de l'isocitrate déshydrogénase NADP+ dépendante ———, de l'isocitrate déshydrogénase NAD+ dépendante - - - - - , de l'isocitratase et du rapport isocitrate déshydrogénase NADP+ dépendante/isocitratase - - - - - relevées sur des broyats mycéliens de la souche BrBv IV cultivée sur maltose, glucose, saccharose et acétate de sodium.

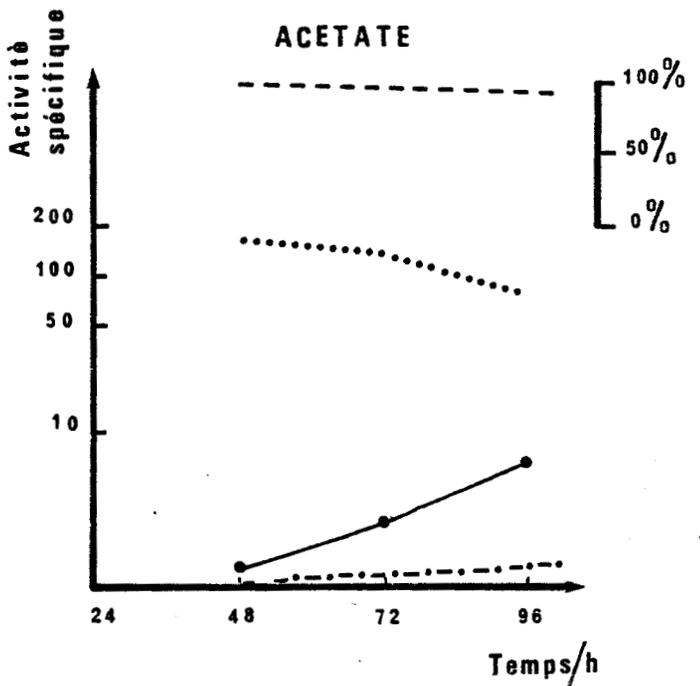
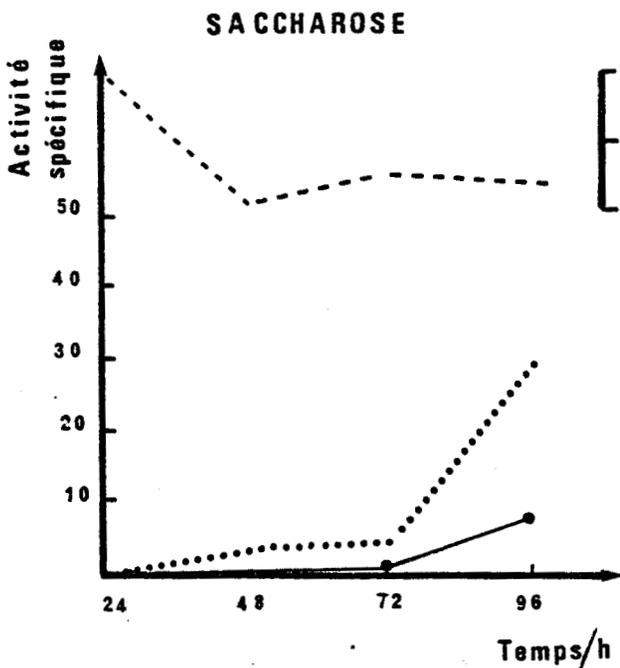
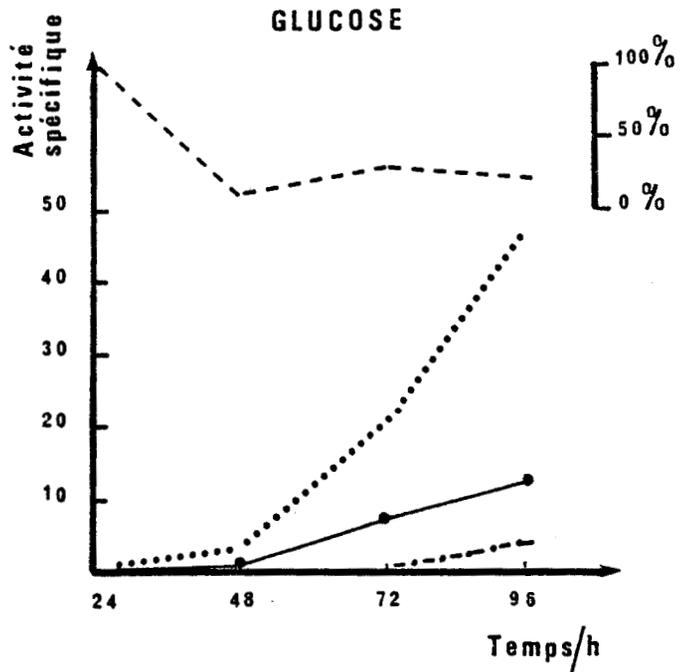
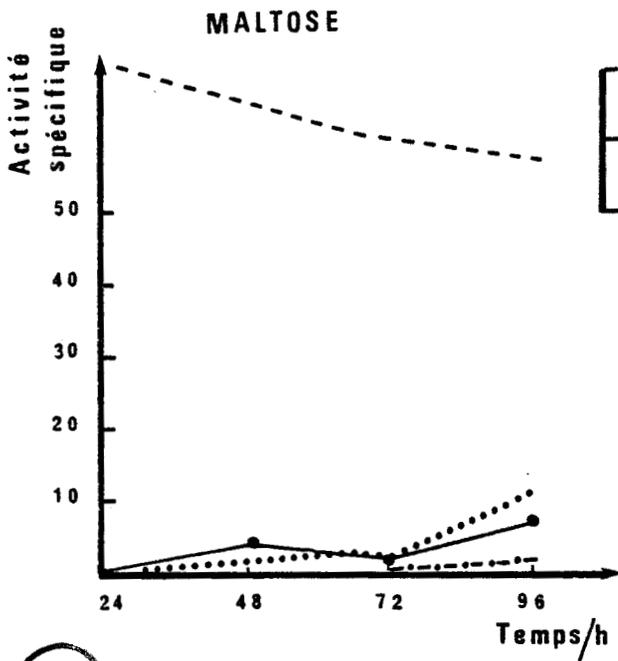
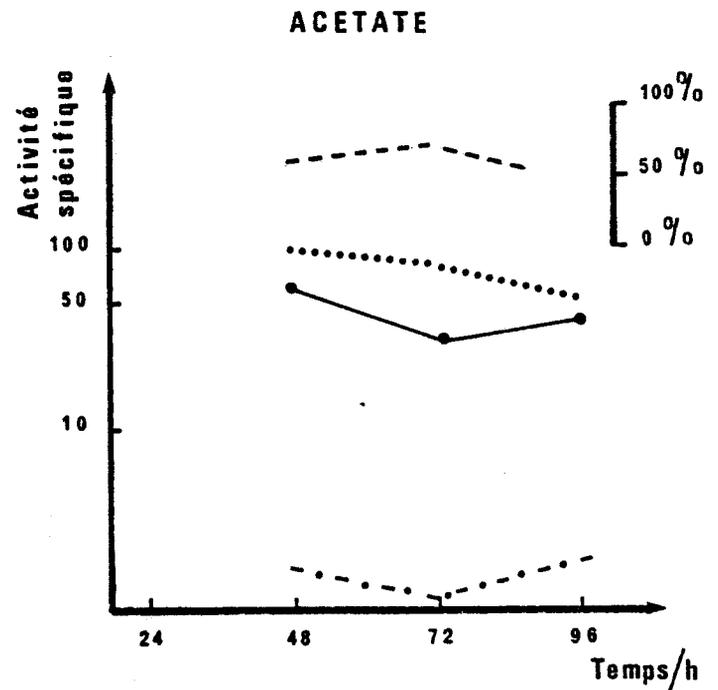
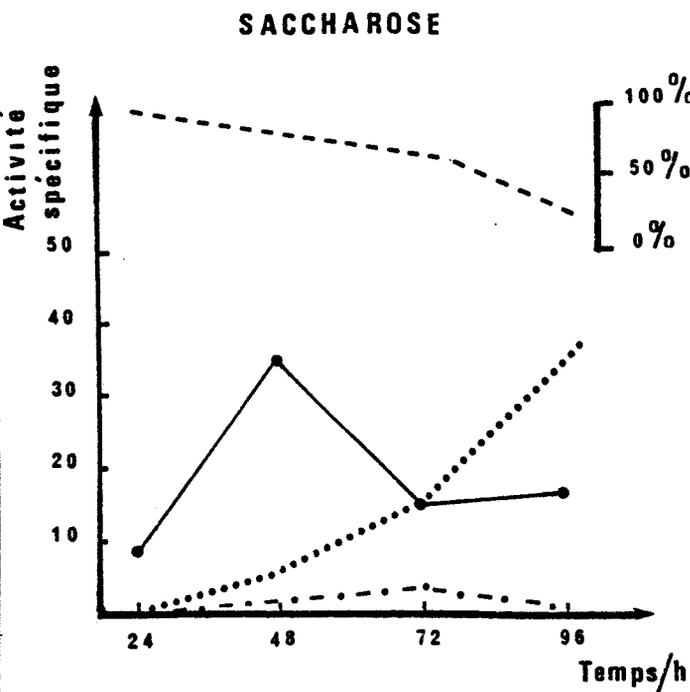
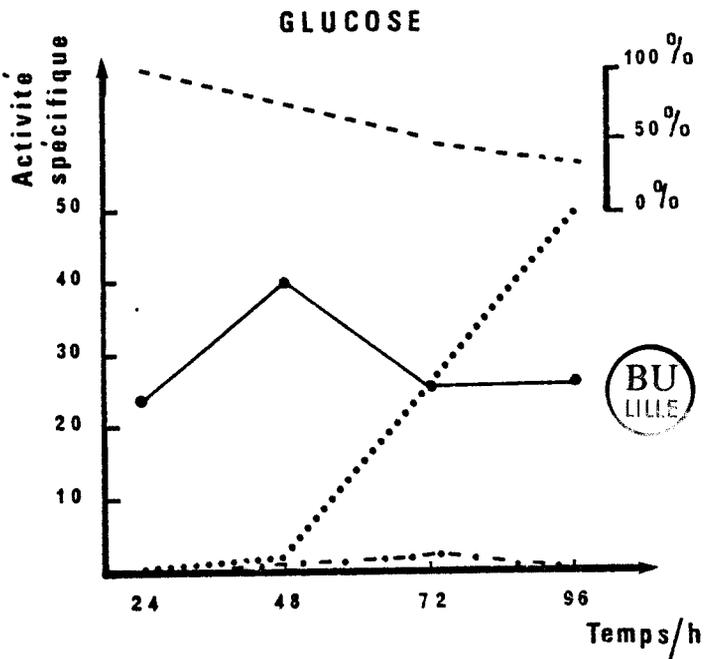
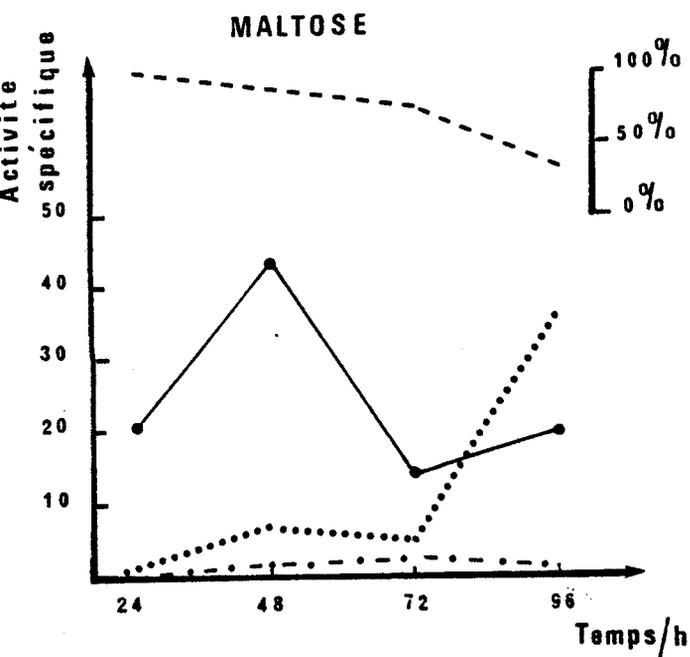


Planche 17 : Evolution de l'activité enzymatique de l'isocitrate déshydrogénase NADP+ dépendante ————, de l'isocitrate déshydrogénase NAD+ dépendante , de l'isocitratase..... et du rapport isocitrate déshydrogénase NADP+ dépendante/isocitratase - - - - relevée sur des broyats mycéliens de la souche 1135 cultivée sur maltose, glucose, saccharose et acétate de sodium.



Enfin, il est généralement admis que cette activité est mitochondriale à l'inverse de l'activité NADP^+ dépendante qui serait en majorité cytoplasmique (PLAUT 1963, INGEBRETSEN 1975). Il pourrait résulter de cette localisation une perte d'activité que nous avons tenté de compenser par l'ajout de Triton X100 (tableau 6).

Tableau 6 : *Activité spécifique de l'isocitrate déshydrogénase NAD^+ dépendante relevée sur des broyats cellulaires de souches cultivées 24 heures sur maltose en fonction de concentrations croissantes de Triton X100.*

Souche	Concentration de Triton X100			
	0 %	0,01 %	0,5 %	1 %
BrBv IV	1,07 \pm 0,05	1,11 \pm 0,04	1,00 \pm 0,03	0,98 \pm 0,05
1135	1,19 \pm 0,07	1,21 \pm 0,03	1,04 \pm 0,05	1,09 \pm 0,06

Nous n'avons pas obtenu d'augmentation significative de l'activité isocitrate déshydrogénase NAD^+ résultant de la solubilisation par le Triton X100 d'éventuelles mitochondries encore intactes.

Il faut supposer que dans nos conditions expérimentales la majorité des mitochondries étant broyées, les différences d'activités enzymatiques enregistrées résultent du rôle physiologique distinct joué par ces deux isoenzymes.

On peut d'ailleurs s'interroger sur la nature et sur l'importance de ce rôle chez BrBv IV où ces activités semblent réprimées par le substrat ou par ses dérivés. Doit-on conclure que chez BrBv IV l'action du cycle de Krebs est effacée par l'action du cycle glyoxylique ?

La réponse à cette question passe par l'étude de l'isocitratase, activité qui, sur des substrats métabolisés via la glycolyse, est réprimée. Seul un composé à deux carbones comme l'acétate déréprime son activité (TURIAN, 1963).

Les résultats enregistrés sur milieu de référence (planche 11) en présence d'acétate, ont montré que son assimilation était identique chez BrBv IV et 1135, et ce pour une croissance similaire. Cependant dans nos conditions culturales, si la somme des activités isocitratase et isocitrate déshydrogénase est très proche, leurs répartitions par contre diffèrent

sensiblement. Chez 1135, une partie importante du flux isocitrique est métabolisée par le cycle de Krebs, alors que chez BrBv IV la quasi-totalité de l'isocitrate est prise en charge par le cycle glyoxylique.

Sur les autres substrats carbonés, la distinction entre les deux souches ne s'établit plus sur la répartition des activités mais bien sur leurs niveaux. Ainsi le rapport isocitrate déshydrogénase/ isocitratase chez BrBv IV cultivé sur maltose est assez proche de ce rapport chez la souche 1135 cultivée sur maltose, glucose ou saccharose. Par contre, les activités isocitrate déshydrogénases sont plus élevées chez 1135 ; de même pour les activités isocitratases qui, rappelons-le, pourraient être à l'origine de l'accumulation de l'acide malique. Cette hypothèse pourrait être renforcée par le fait que, cultivée sur glucose et saccharose, la souche BrBv IV présente un rapport isocitrate déshydrogénase/ isocitratase qui après 48 heures de culture est nettement en faveur du cycle glyoxylique, alors que cultivée dans les mêmes conditions sur maltose ce rapport est en faveur du cycle de Krebs.

Bien que ces résultats aillent dans le sens d'une acidification des milieux de culture par l'intermédiaire de l'isocitratase, il faut cependant remarquer que, d'une part son activité reste faible particulièrement à 48 heures, période d'accumulation de l'acide malique, et que d'autre part, chez la souche 1135, le rapport de l'isocitrate déshydrogénase NADP^+ dépendante/isocitratase montre la prépondérance du cycle citrique.

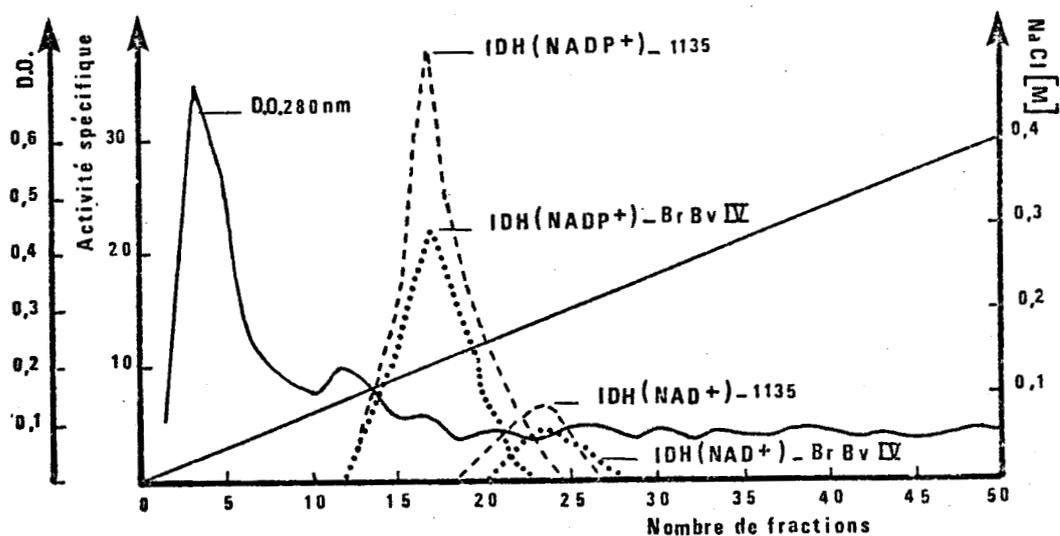
Ceci ajouté au fait que l'activité isocitrate déshydrogénase NADP^+ apparaît répressée par le substrat chez la souche BrBv IV, alors qu'elle ne l'est pas chez la souche 1135, nous a conduits à pousser plus loin l'étude de ces deux enzymes pour tenter, d'une part d'établir la balance entre leur activité, et d'autre part de définir les caractéristiques physicochimiques propres à chaque enzyme, tant chez la souche BrBv IV que chez la souche 1135.

a) Purification et étude des constantes de l'isocitrate déshydrogénase NAD^+ et NADP^+ dépendante

Nous avons donc extrait et purifié l'isocitrate déshydrogénase à partir du mycélium des deux souches cultivées pendant 48 heures sur maltose (annexe technique n°2). L'analyse des fractions d'éluion exposée dans la figure 3 montre deux pics d'activité distincts, un pic important correspondant à l'activité isocitrate déshydrogénase NADP^+ dépendante et un pic nettement plus faible correspondant à la forme NAD^+ dépendante, confirmant en cela les résultats observés sur les extraits bruts.

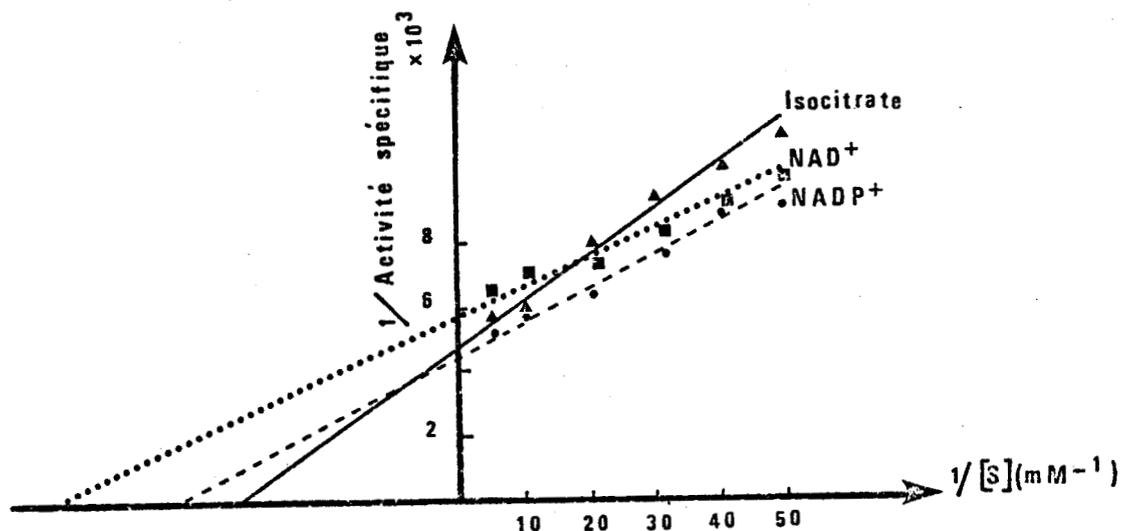
Pour les deux souches, nous avons obtenu une identité de courbes, mis à part leur amplitude.

Figure 3 : Séparation des isoenzymes de l'isocitrate déshydrogénase des souches BrBv IV ●●●● et 1135 ----- sur DEAE-TRISACRYL M. Tampon d'é-lution : tris HCl 50 mM pH 7,8 contenant 1 mM Mg cl₂, 0,1 mM de dithi-otréitol et 3 mM d'acide citrique. Débit : 30 cm h⁻¹. Pour les autres conditions voir annexe technique n° .



Nous avons calculé pour ces deux activités et pour les deux souches le KM vis à vis du substrat et du coenzyme.

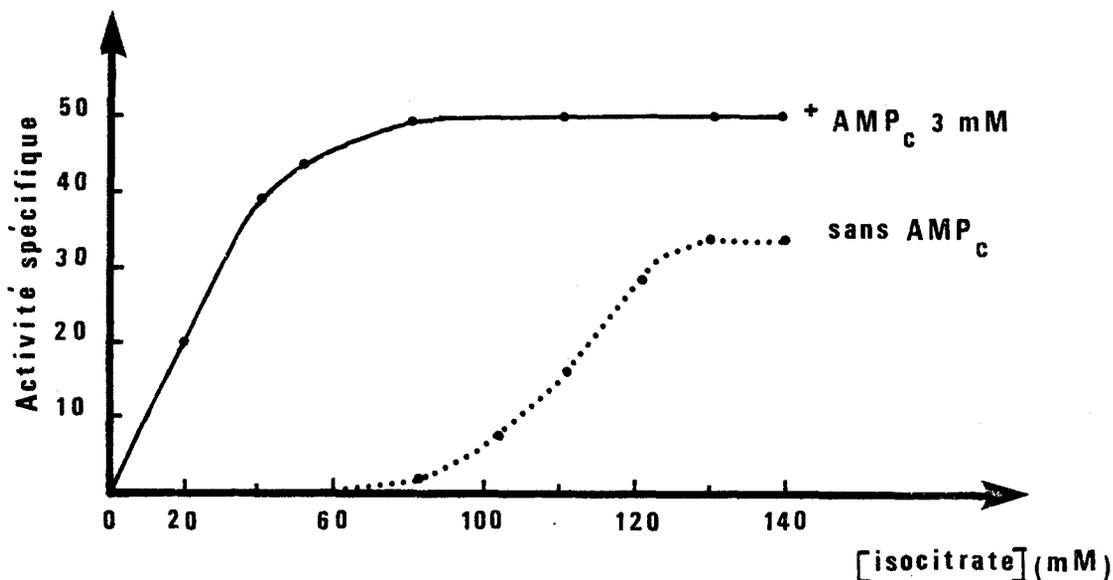
Figure 4 : Calcul des constantes de l'isocitrate déshydrogénase NAD⁺ et NADP⁺ dépendante par la méthode de Lineweaver-Burk.



Les KM calculés à partir de la figure 4 montrent que pour les deux souches l'affinité de l'isocitrate déshydrogénase vis à vis de l'isocitrate se situe entre $27 \pm 6 \mu\text{M}$ quel que soit l'accepteur d'élec-trons ; par contre l'affinité de l'enzyme NADP⁺ dépendante vis à vis de son cofacteur est de $16 \pm 4 \mu\text{M}$, alors que pour l'enzyme NADP⁺ dépendante l'affinité vis à vis de NAD⁺ est de $22 \pm 4 \mu\text{M}$.

L'affinité de l'isocitrate déshydrogénase vis à vis de l'isocitrate est régulée par l'AMP (figure 5).

Figure 5 : Activité de l'isocitrate déshydrogénase NAD^+ dépendante en absence et en présence d'AMPc.



La figure 5 montre que l'isocitrate déshydrogénase NAD^+ dépendante, en présence d'AMP, se comporte comme une enzyme à site unique alors qu'en l'absence de cet effecteur la visualisation de l'activité enzymatique, en fonction de la concentration en substrat, est de forme sigmoïdale, c'est-à-dire qu'aux fortes concentrations des substrats le profil de la courbe apparaît semblable au modèle de MICHAELIS-MENTEN alors qu'aux faibles concentrations la vitesse de réaction est d'ordre supérieur à 1.

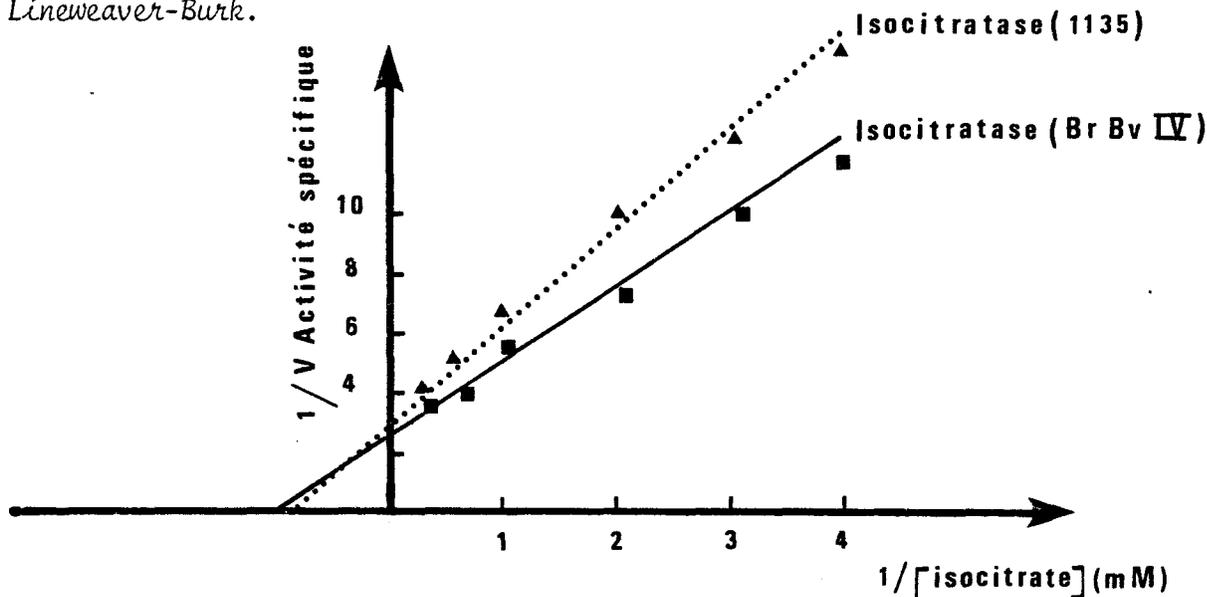
Les travaux de MONOD et coll. (1965) ont montré qu'une telle enzyme possède plusieurs sites catalytiques interdépendants. Ainsi, la fixation du substrat sur un site augmente l'efficacité catalytique des autres sites ; certains effecteurs peuvent également influencer la fixation du substrat et ainsi agir sur la vitesse de réaction. Tel est le cas de l'AMP qui va favoriser l'activité de l'isocitrate déshydrogénase NAD^+ dépendante ; cette enzyme étant mitochondriale, on peut penser que par ce biais l'organisme agit en fonction de son niveau énergétique sur la formation du NADH et donc sur la phosphorylation oxydative.

L'isocitrate déshydrogénase en milieu réducteur peut aussi carboxyler l' α -cétoglutarate (KRITZMAN et coll., 1977). Nos résultats indiquent que les souches BrBv IV et 1135 sont capables en présence d' HCO_3^- et d' NADPH de réduire l' α -cétoglutarate en isocitrate et que seul l' IDH NADP^+ possède cette fonction.

b) Purification et étude des constantes de l'isocitratase

Comme pour l'isocitrate déshydrogénase, nous avons extrait et purifié l'isocitratase (annexe technique n° 2). D'après les activités relevées dans les fractions d'éluion, l'isocitratase semble être portée chez 1135 comme BrBv IV par une même protéine dont le KM vis à vis de l'isocitrate est de $111 \pm 11 \mu\text{M}$ (figure 6).

Figure 6 : Calcul des constantes de l'isocitratase par la méthode de Lineweaver-Burk.



L'étude des constantes de l'isocitratase et de l'isocitrate déshydrogénase montre que cette dernière enzyme sera toujours pleinement saturée bien avant l'isocitratase, et ceci avec une V_{\max} en faveur de l'isocitrate déshydrogénase ; l'équilibre entre ces deux activités passe donc très probablement par une répression efficace de l'isocitrate déshydrogénase (VIDAL et MACHADO, 1977).

c) Etude de la régulation du rapport isocitrate déshydrogénase/isocitratase

RUFFO et coll. (1962) rapportent l'inhibition de la respiration des mitochondries de foie de rat par l'hydroxy-P-oxalosuccinate (ou oxalomalate) composé formé par la condensation non enzymatique du glyoxalate et de l'oxaloacétate. VIDAL et MACHADO (1977) chez *Tetrahymena pyriformis* montrent que les concentrations nécessaires à l'inhibition de l'isocitrate déshydrogénase par ce composé sont non physiologiques et proposent une régulation basée sur le rapport NADH/NAD^+ , $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$.

Nous avons cherché dans cette direction et montré que l'activité de l'isocitrate déshydrogénase chez BrBv IV et 1135 était inversement proportionnelle à la concentration en coenzyme réduit présente dans le milieu (tableau 7).

Tableau 7 : Effet de NADPH et de NADH sur l'activité de leur enzyme respective, mesuré après 2 minutes d'incubation.

Souche	Concentration initiale en coenzyme oxydé (μM)	Concentration initiale en coenzyme réduit (μM)	Pourcentage d'inhibition par le coenzyme réduit	
			IDH NADP ⁺	IDH NAD ⁺
BrBv IV	10	10	28	34
	10	20	49	61
	10	30	78	81
1135	10	10	38	33
	10	20	58	65
	10	30	74	84

Nous avons ensuite déterminé les K_i de NADPH et NADH vis à vis de l'isocitrate déshydrogénase NAD⁺ et NADP⁺ dépendante (figures 7 et 8).

Figure 7 : Activité de l'isocitrate déshydrogénase NAD⁺ dépendante en fonction de concentrations croissantes de NADH.

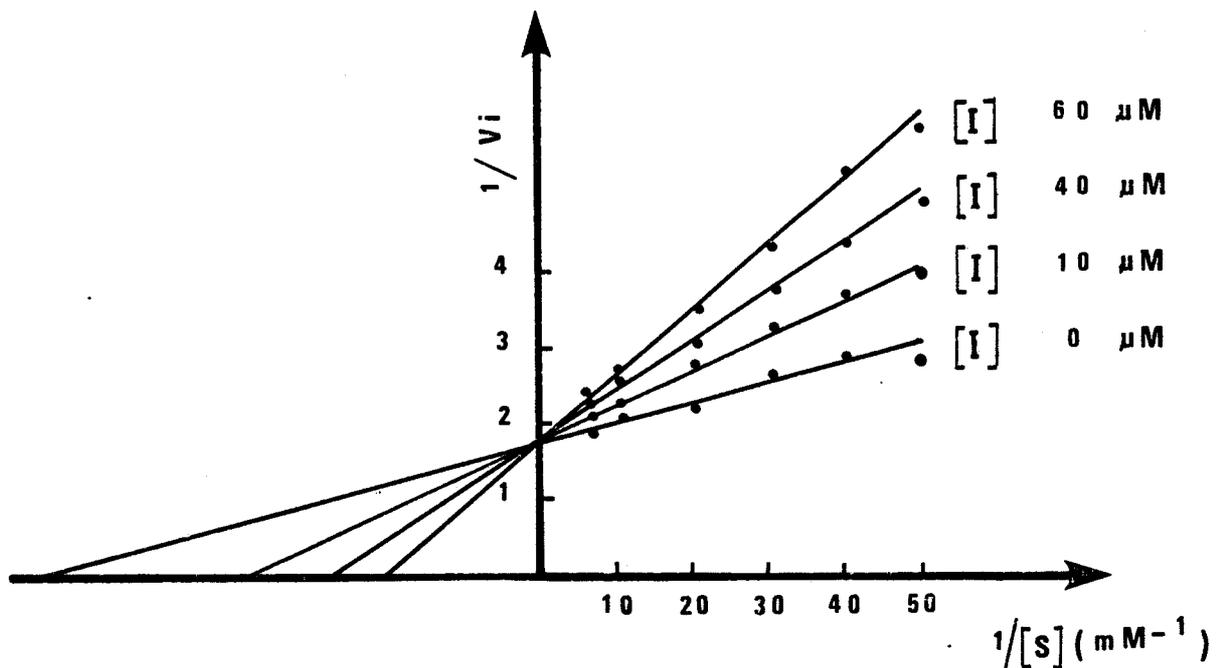
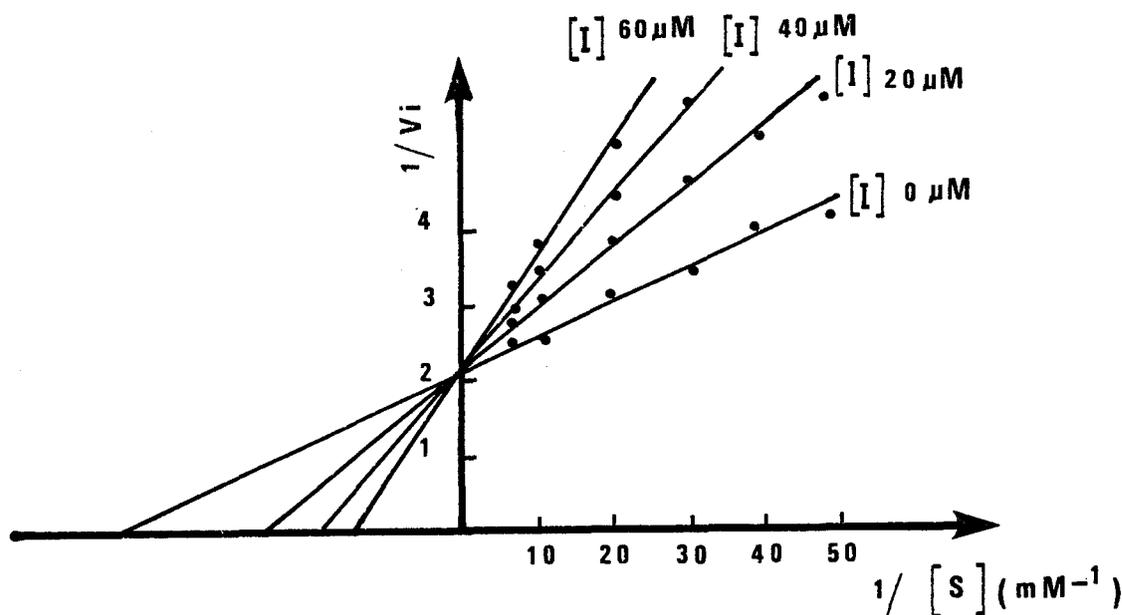


Figure 8 : Activité de l'isocitrate déshydrogénase NADP^+ dépendante en fonction de concentrations croissantes de NADPH.



Dans nos conditions expérimentales, NADPH et NADH sont pour leurs enzymes respectives des inhibiteurs compétitifs avec des K_i de l'ordre de $34 \pm 6 \mu\text{M}$ pour NADPH et 29 ± 7 pour NADH.

Avec des K_i proches de K_M il semble bien que NADH et NADPH sont les inhibiteurs physiologiques des activités isocitrate déshydrogénase NAD^+ et NADP^+ , régulant ainsi les rapports des activités citriques et glycoliques. Partant de ces considérations, nous avons déterminé les concentrations intramycéliennes des coenzymes chez BrBv IV et 1135 ; il est cependant évident que face à l'hétérogénéité structurale du mycélium et face à l'hétérogénéité dans la répartition de ces composés au sein de la structure cellulaire, nos résultats n'auront qu'une valeur approximative du potentiel rédox du mycélium (tableau 8).

Tableau 8 : Evolution des concentrations et des rapports intramycéliens des coenzymes nicotinamidiques oxydés et réduits relevés chez les souches BrBv IV et 1135 cultivées sur maltose.

Temps de culture	NAD^+		NADH		NADH/NAD^+	
	BrBv IV	1135	BrBv IV	1135	BrBv IV	1135
24 H	$1,71 \pm 0,07$	$1,24 \pm 0,09$	$0,52 \pm 0,01$	$0,85 \pm 0,03$	0,30	0,68
48 H	$1,66 \pm 0,09$	$1,39 \pm 0,05$	$0,59 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,04$	0,35	0,49
72 H	$1,42 \pm 0,04$	$1,15 \pm 0,06$	$0,63 \pm 0,04$	$0,53 \pm 0,02$	0,44	0,46
96 H	$1,13 \pm 0,05$	$1,04 \pm 0,04$	$0,84 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,01$	0,74	0,68
Temps de culture	NADP^+		NADPH		$\text{NADPH}/\text{NADP}^+$	
	BrBv IV	1135	BrBv IV	1135	BrBv IV	1135
24 H	$0,09 \pm 0,001$	$0,08 \pm 0,001$	$0,22 \pm 0,009$	$0,31 \pm 0,005$	2,4	3,8
48 H	$0,07 \pm 0,002$	$0,06 \pm 0,002$	$0,19 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,003$	2,7	4
72 H	$0,06 \pm 0,002$	$0,03 \pm 0,001$	$0,15 \pm 0,005$	$0,10 \pm 0,002$	2,5	3,3
96 H	$0,10 \pm 0,003$	$0,09 \pm 0,001$	$0,19 \pm 0,003$	$0,21 \pm 0,006$	1,9	2,3

Résultats exprimés en $\mu\text{moles g}^{-1}$ mycélium lyophilisé.

D'une manière générale, le rapport NADH/NAD chez les souches BrBv IV et 1135 est toujours inférieur à l'unité ; sans doute doit-on y voir la conséquence des réactions d'oxydation impliquées dans les processus énergétiques cellulaires. Néanmoins il faut remarquer que si la concentration globale en NAD⁺ et NADH est très proche chez les deux souches, le rapport de ces deux coenzymes par contre diffère sensiblement. Ainsi dans les 48 premières heures de croissance les concentrations en coenzymes réduits sont plus élevées chez la souche 1135. Cependant les réactions NAD(H) dépendantes n'étant pas à l'image des réactions NADP(H) dépendantes essentiellement cytoplasmiques, (BOTHAM et RATLEDGE 1979), il est difficile dans l'état de nos connaissances de préjuger des rapports NADH/NAD⁺ cytoplasmiques et mitochondriaux et donc d'extrapoler l'influence d'un tel rapport sur l'équilibre de l'isocitrate déshydrogénase NAD⁺ dépendante. Tout au plus pouvons-nous remarquer que le métabolisme de la souche BrBv IV est plus oxydatif donc probablement plus énergétique au niveau de la phosphorylation oxydative que le métabolisme de la souche 1135, rejoignant en cela l'hypothèse déjà pressentie au début de ce travail.

Selon BRUINENBERT et coll. (1983a, b), la production de NADPH est en majorité imputable à la voie des hexoses monophosphates dont les enzymes glucose-6-P-déshydrogénase et 6-P-gluconate-déshydrogénase sont apparues les plus actives *in vitro* chez la souche 1135, ce qui semble d'ailleurs confirmé par les concentrations en NADPH plus élevées enregistrées chez cette souche. Cependant le rapport NADPH/NADP⁺ est constamment situé, tant chez la souche 1135 que chez la souche BrBv IV, dans une zone où l'activité de l'isocitrate déshydrogénase est inhibée. L'ampleur de cette inhibition *in vivo* reste une inconnue, mais il semblerait que, malgré son KM élevé et Vmax faible par rapport à l'isocitrate déshydrogénase, l'isocitratase puisse jouer un rôle dans l'oxydation de l'isocitrate ; toutefois les caractères physico-chimiques de cette enzyme ajoutés aux faibles activités rencontrées lors des dosages *in vitro* apparaissent comme incompatibles avec un rôle majeur du cycle glyoxylique dans l'accumulation de l'acide malique.

2 - ACTIVITÉ MALATE SYNTHÉTASE

L'activité de la malate synthétase confirme ces observations. Il existe, comme le montrent les résultats des planches 18 et 19, une certaine corrélation entre les activités malate synthétase et isocitratase, corrélation portant sur le profil d'activité mais non sur l'amplitude. Apparemment une quantité non négligeable d'acide glyoxylique échappe à l'action de la malate synthétase, cet excès d'acide glyoxylique n'ayant pu être retrouvé dans

Planche 18 : Evolution de l'activité enzymatique de l'isocitratase - - - - - et de la malate synthétase ———— relevée sur des broyats mycéliens de la souche BrBv IV cultivée sur maltose, glucose, saccharose et acétate de sodium.

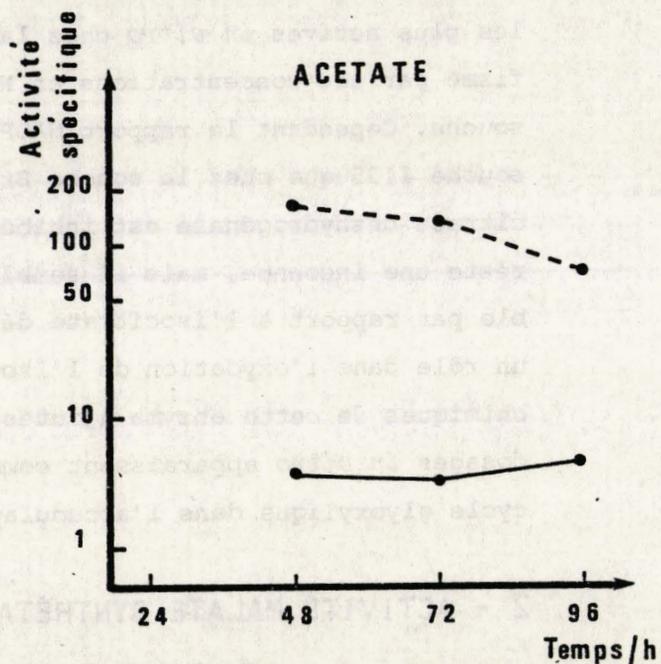
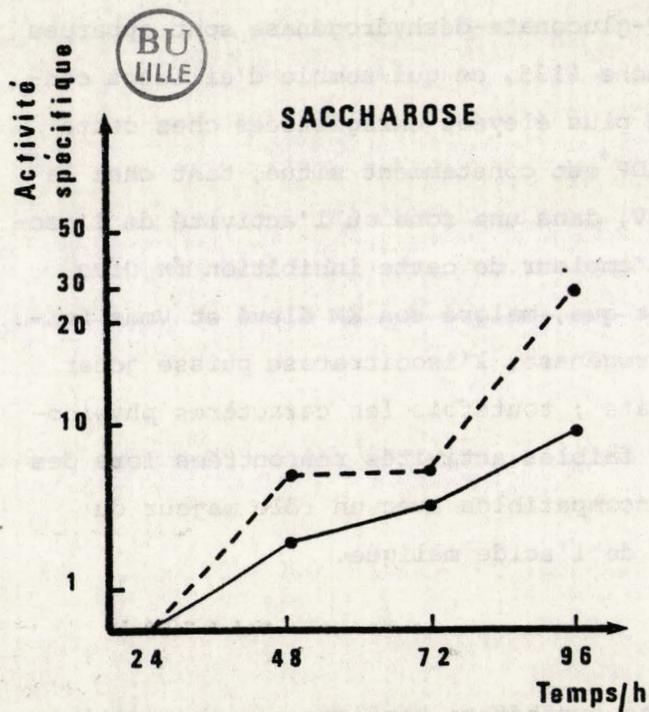
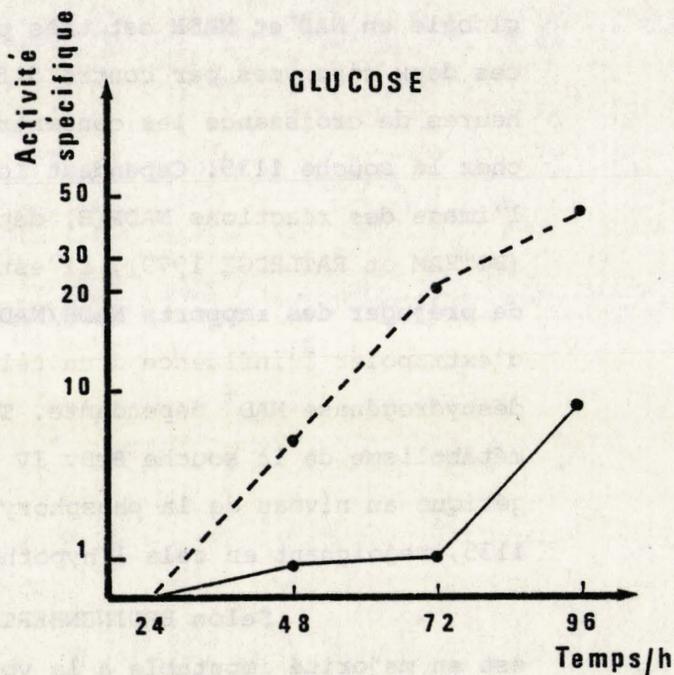
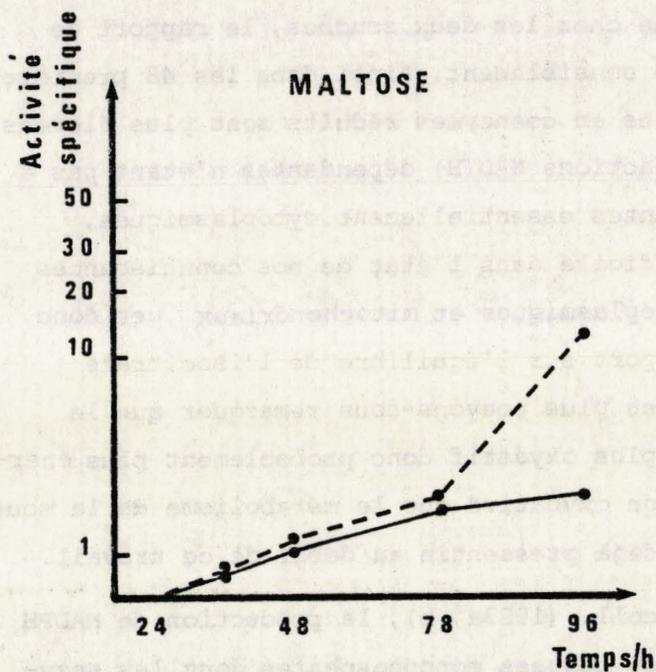
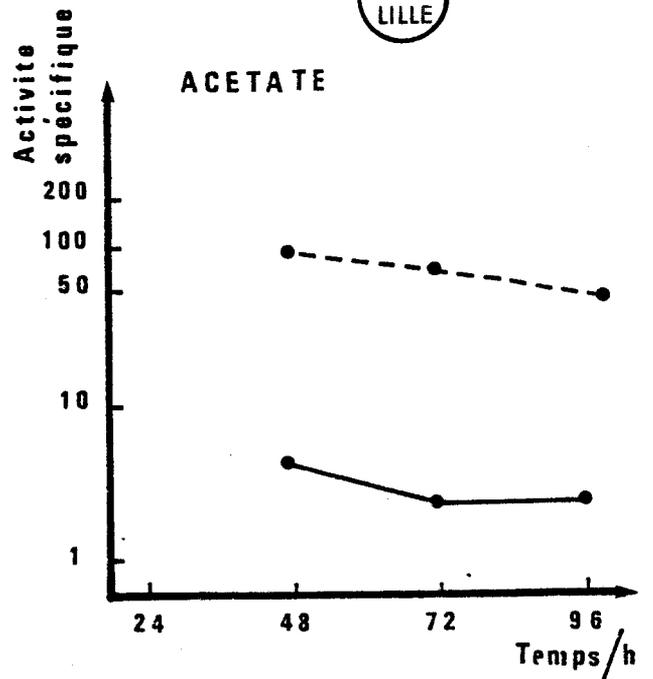
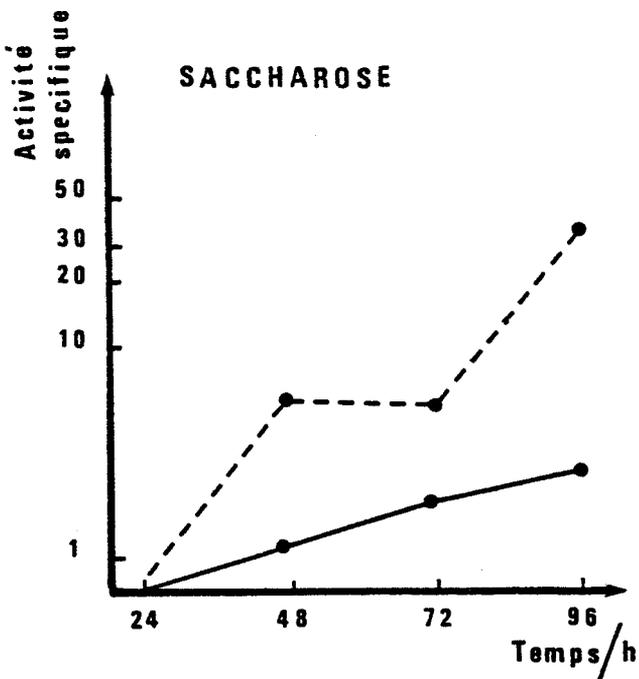
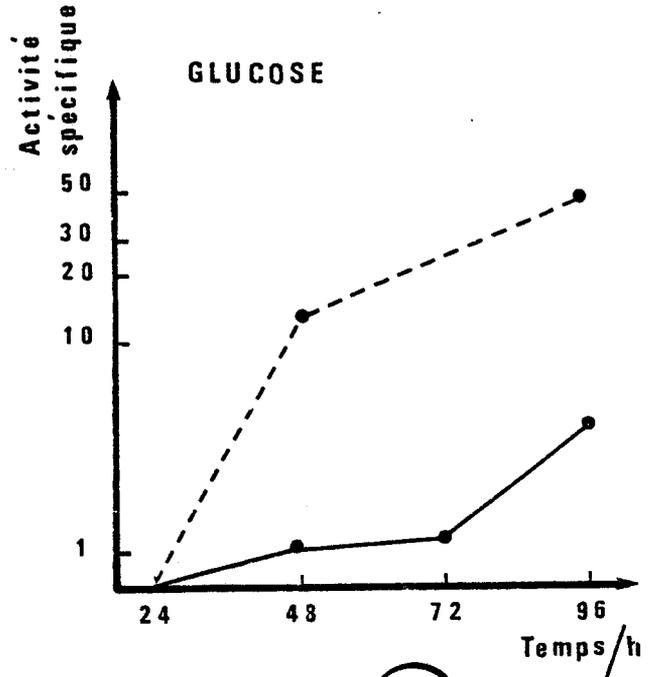
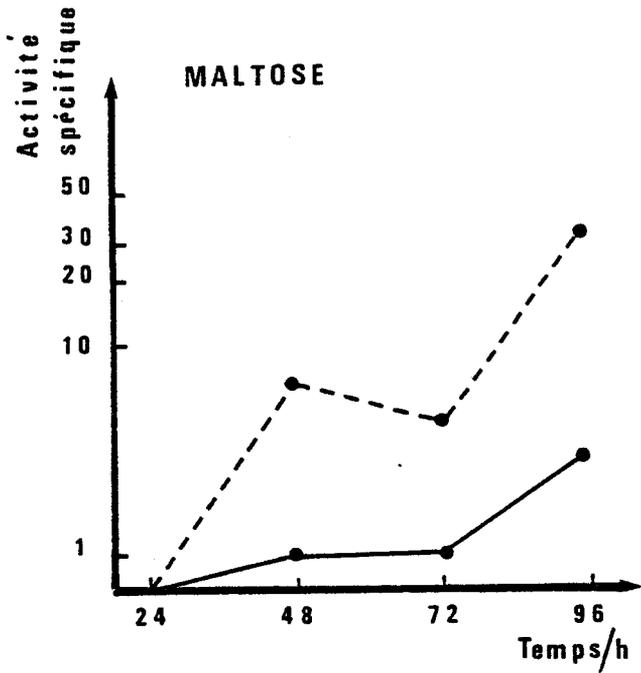


Planche 19 : Evolution de l'activité enzymatique de l'isocitratase - - - - - et de la malate synthétase ———— relevée sur des broyats mycéliens de la souche 1135 cultivée sur maltose, glucose, saccharose et acétate de sodium.



les filtrats de culture ; il faut supposer que cet élément est impliqué dans d'autres voies métaboliques. Chez *Sclerotium rolfsii*, le glyoxylate provenant de l'activité isocitratase est réduit en oxalate par une glyoxylate oxydo-réductase (MAXWELL, 1968). Nous n'avons pas trouvé chez *A. oryzae* de telles activités, de même que dans les filtrats de culture nous n'avons pas trouvé d'acide oxalique.

Chez *Bacillus cereus*, le glyoxylate peut être réduit en glycolate (MEGRAW et BEERS, 1964), mais là encore nous n'avons pu déceler la présence d'acide glycolique dans les filtrats de culture d'*A. oryzae*.

Chez *N. crassa*, le glyoxylate peut être transaminé en glycine par la transaminase alanine glyoxylate (TURIAN, 1961). Cette étape-clef de la différenciation morphologique chez *N. crassa* (TURIAN et COMBEPINE, 1963 ; COMBEPINE et TURIAN, 1967) pourrait, chez *A. oryzae*, être une voie possible du catabolisme du glyoxylate.

3 - ACTIVITES SUCCINO-DÉSHYDROGÉNASE ET FUMARASE

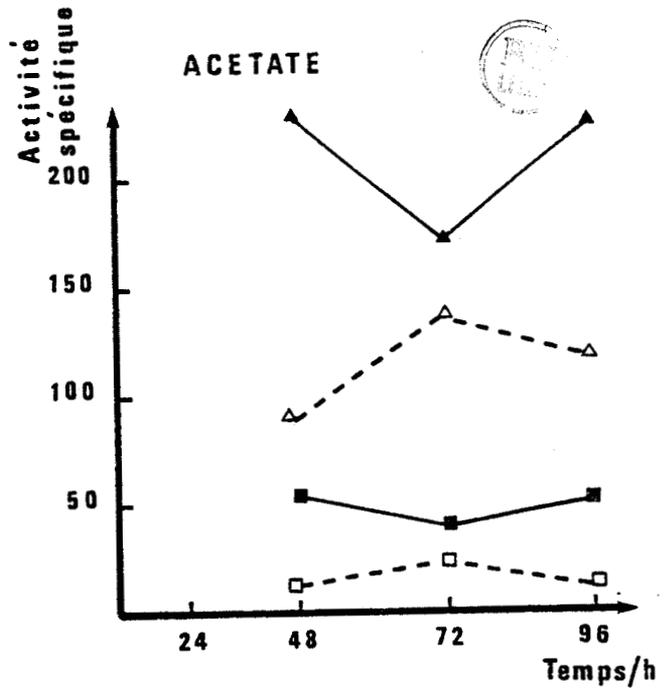
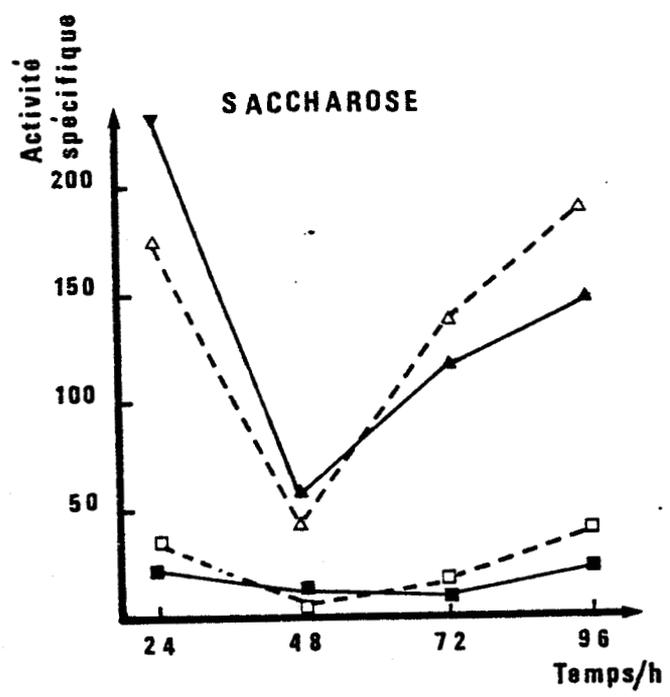
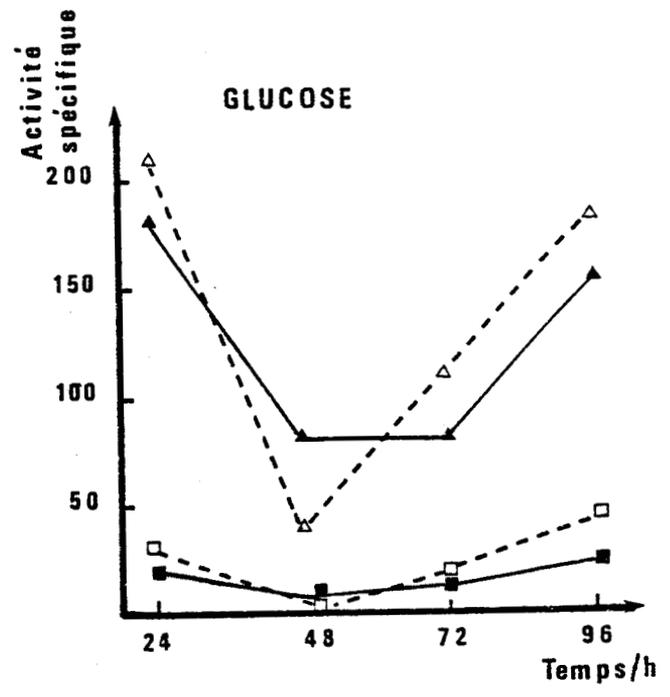
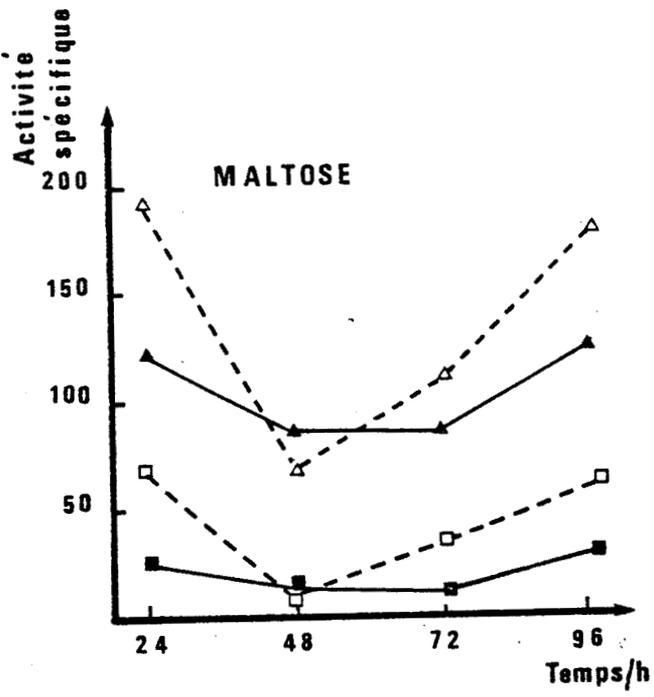
Associé à la production d'acide malique, le cycle glyoxylique entraîne la formation d'acide succinique, acide qui n'a été retrouvé qu'en faible quantité dans les filtrats de culture. Nous avons donc étudié la succino-déshydrogénase, enzyme majeure du métabolisme de l'acide succinique, puis la fumarase, enzyme-relais de la succino-déshydrogénase (planche 20).

Chez les souches BrBv IV et 1135 cultivées sur un substrat empruntant la glycolyse, ces deux enzymes présentent un minimum d'activité à 48 heures, période où l'acide malique est accumulé dans les milieux de culture. Cette répression pourrait donc résulter directement ou indirectement de cette accumulation. Un élément en faveur de cette hypothèse est la chute brutale des activités, particulièrement de la fumarase, dans les conditions favorables à la synthèse d'acide malique.

Ces résultats posent à nouveau la question du rôle joué par le cycle glyoxylique dans l'accumulation de l'acide malique. En effet, une participation massive du cycle glyoxylique à l'accumulation de ce composé suppose par définition la formation d'une quantité équivalente d'acide succinique. En fonction des activités succino-déshydrogénase et fumarase, nous aurions dû retrouver dans les filtrats de culture une présence conséquente d'acide succinique et fumarique.

La présence de ces acides à l'état de traces confirme le rôle mineur joué par le cycle glyoxylique dans l'accumulation de l'acide malique chez les souches 1135 et BrBv IV.

Planche 20 ; Evolution de l'activité enzymatique de la fumarase (Δ - - - Δ souche 1135 \blacktriangle - - - \blacktriangle souche BrBv IV) et de la succino-déshydrogénase (\square - - - \square souche 1135 \blacksquare - - - \blacksquare souche BrBv IV) relevée sur des broyats mycéliens de souches cultivées sur maltose, glucose, saccharose et acétate de sodium.

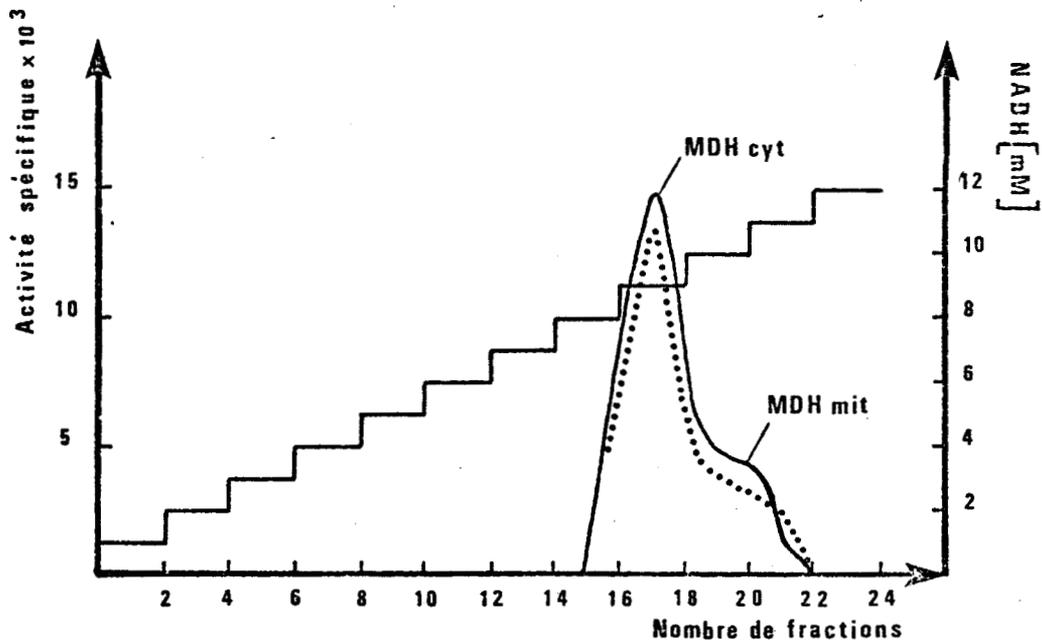


4 - ACTIVITÉ MALATE DÉSHYDROGÉNASE

L'accumulation d'acide malique *via* le cycle glyoxylique suppose une déficience au niveau de la malate déshydrogénase, or les résultats de la planche 21 montrent que cette enzyme est non seulement la plus active du cycle de Krebs, mais aussi la plus active chez 1135.

Ces résultats quelque peu déconcertants dans le cadre de l'hypothèse citée plus haut nous ont conduits à aborder la régulation de cette enzyme. Les travaux de fractionnement ont révélé la présence de deux protéines portant l'activité malate déshydrogénase (figure 9), toutes deux ayant comme coenzyme NADH. En référence aux travaux de MA et coll. (1981), on peut penser que le pic n° 1 est d'origine cytoplasmique alors que le pic n° 2 est d'origine mitochondriale. Pour le protocole d'extraction voir annexe n°2.

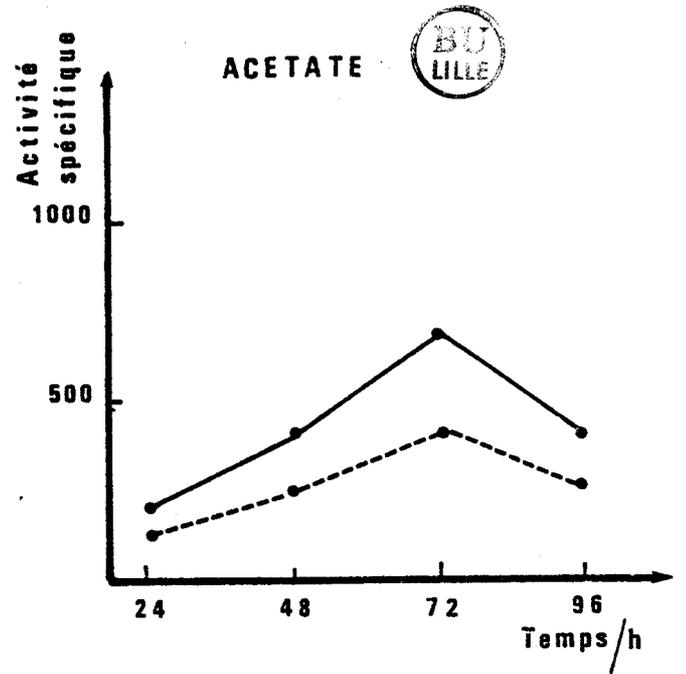
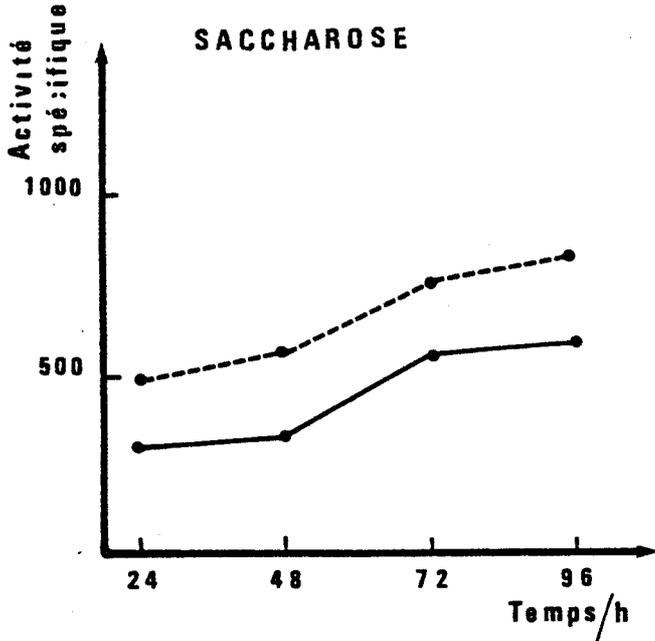
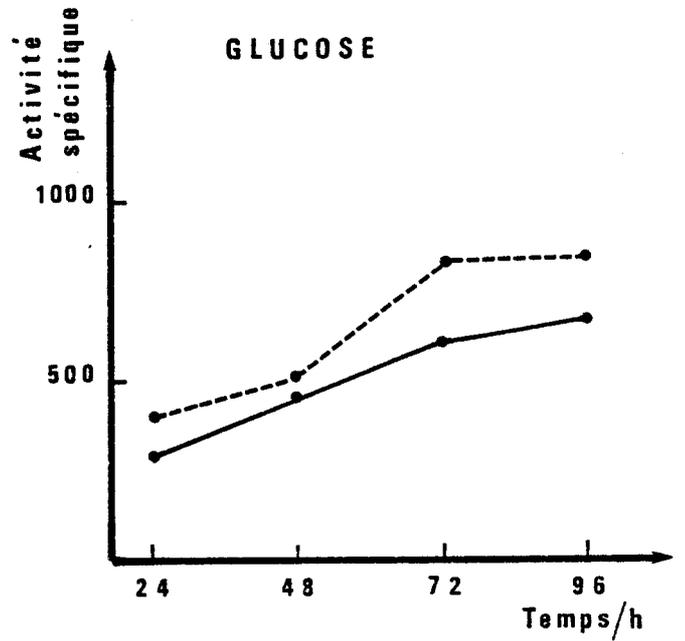
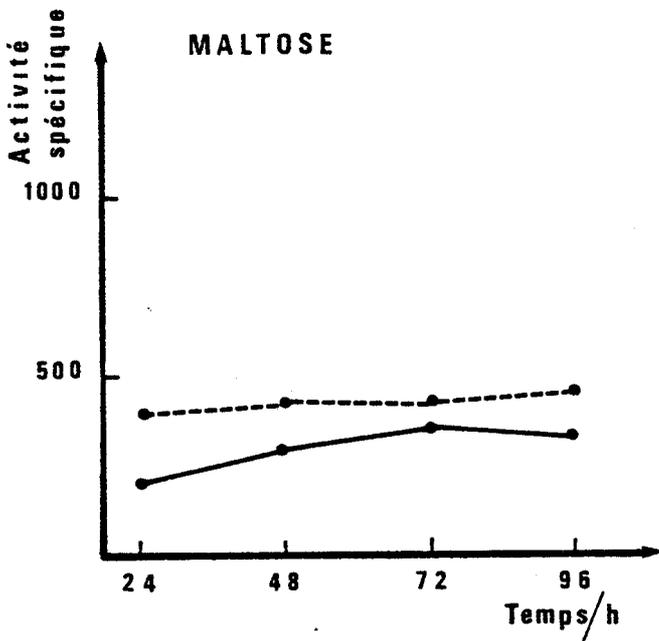
Figure 9 : Séparation des isoenzymes de la malate déshydrogénase des souches BrBv IV..... et 1135 — sur Blue Sepharose CL-6B. Tampon d'éluion : Tris HCl 15 mM pH 6,8 contenant 5 mM Mg Cl₂ 0,1 mM de dithiotreitol. Pour les autres conditions voir annexe technique n° .



Les constantes calculées par la méthode de Lineweaver-Burk (figure 10) sont respectivement pour la malate déshydrogénase cytoplasmique et mitochondriale de l'ordre de :

- 25 $\mu\text{M} \pm 6$ pour l'oxaloacétate et de 70 $\mu\text{M} \pm 9$ pour NADH
- 32 $\mu\text{M} \pm 4$ pour l'oxaloacétate et de 95 $\mu\text{M} \pm 7$ pour NADH

Planche 21 : Evolution de l'activité enzymatique de la malate déshydrogénase relevée sur des broyats mycéliens de la souche BrBv IV — — — et 1135 - - - - cultivées sur maltose, glucose, saccharose et acétate de sodium.



Ces travaux nous ont permis de constater que l'équilibre de la réaction Malate + NAD⁺ \rightleftharpoons oxaloacétate + NADH + H⁺ était orienté vers la réduction de l'oxaloacétate. REEVES (1971) donne pour cette équation une constante de 1,04 - 1,17 10⁻¹². Un déplacement de cet équilibre vers la droite n'est possible qu'en impliquant l'oxaloacétate dans une autre réaction ; ainsi *in vitro* on utilise la réaction Malate + NAD⁺ + hydrazine \longrightarrow oxalohydrazone + NADH + H⁺. Nos recherches sur l'activité citrate synthétase se sont limitées à quelques expériences qui furent cependant suffisantes pour démontrer que cette enzyme ne pouvait justifier d'une prise en charge de l'oxaloacétate au niveau du cycle de Krebs.

Les concentrations d' α -cétoglutarate pratiquement nulles accumulées dans les milieux de culture après 48 heures laissent à penser que la glutamate oxalotransaminase n'est pas non plus en mesure de piéger l'oxaloacétate.

Tous ces éléments mettent en lumière le rôle que pourrait jouer la malate déshydrogénase dans l'acidification des milieux de culture dans le cas d'une carboxylation de composés en C3 issus de la glycolyse, bien que jusqu'à présent aucun élément ne vienne étayer cette hypothèse. Restait également à envisager la possibilité d'une inhibition de la malate déshydrogénase. En effet, MA et coll. (1981) ont démontré que cette enzyme pouvait être inhibée par l' α -cétoglutarate. Bien qu'il soit accumulé en faibles concentrations à cette période, nous avons voulu étudier cette hypothèse.

5 - ACTIVITÉ α -CÉTOGLUTARATE DÉSHYDROGÉNASE

Au niveau du cycle de Krebs, l' α -cétoglutarate est décarboxylé en succinate par l' α -cétoglutarate déshydrogénase, enzyme que nous n'avons pu mettre en évidence chez *A. oryzae* malgré les deux techniques utilisées :

- technique colorimétrique
- technique respirométrique.

Ces résultats conduisent à penser que les souches BrBv IV et 1135, tout comme *A. niger* (NG et coll., 1973) ou *Mucor racemosus* (O'CONNEL et PAZNOKAS, 1980), ne possèdent pas un cycle tricarboxylique actif normal, ainsi que nous l'avions déjà laissé entendre dans le chapitre I.

Si cette déficience dans l'activité du cycle de Krebs est très certainement à la base de l'accumulation de l'acide α -cétoglutarique, les mécanismes responsables de cette accumulation restent obscurs. Cependant l'étude physiologique de la biosynthèse de l' α -amylase nous a montré le rôle déterminant joué par la source d'azote dans cette accumulation ; ainsi le glutamate

favorise en fin de croissance une accumulation d'acide α -cétoglutarique, alors qu'une forte concentration d'ions NH_4^+ entraîne la formation d'acide glutamique. Cet équilibre entre l'acide glutamique et l'acide α -cétoglutarique est contrôlé au niveau du métabolisme, notamment par la glutamate déshydrogénase, enzyme dont nous allons étudier l'activité chez les souches BrBv IV et 1135.

6 - ACTIVITÉ GLUTAMATE DÉSHYDROGÉNASE

Chez *A. oryzae* tout comme chez *N. crassa* (FINCHAM, 1962) ou chez *A. nidulans* (PATEMAN, 1969), on distingue deux activités glutamate déshydrogénase :

- une forme NADP^+ dépendante à fonction aminatrice
- une forme NAD^+ dépendante à fonction désaminatrice.

Les résultats des planches 22 et 23 démontrent l'alternance dans l'activité de ces deux enzymes. Dans les premières heures de croissance l' α -cétoglutarate produit par le cycle de Krebs est transformé en glutamate par l'activité glutamate déshydrogénase NADP^+ , alors qu'en fin de croissance c'est le glutamate qui est transformé en acide α -cétoglutarique par la glutamate déshydrogénase NAD^+ dépendante. Cette alternance trouve confirmation dans la littérature puisque, selon KINGHORN et PATEMAN (1974), la forme NAD^+ dépendante serait sujette à la répression catabolique. Son activité croissante observée chez les souches 1135 et BrBv IV en fin de culture serait liée à l'épuisement de la source de carbone. L'activité décroissante de la glutamate déshydrogénase NADP^+ dépendante serait quant à elle également liée à l'épuisement de la source de carbone, puisque HYNE (1974) a montré que le glutamate assimilé comme source de carbone affectait cette activité ; or, de l'analyse des planches 8 à 10, il ressort que le glutamate pourrait en fin de croissance palier à l'épuisement du substrat et être ainsi utilisé comme source de carbone principale. Il est d'ailleurs remarquable d'observer que c'est la souche 1135, où les consommations de glutamate sont le plus élevées en fin de croissance, qui offre l'inflection la plus prononcée de cette activité.

PATEMAN (1969) montre également que la synthèse de glutamate déshydrogénase NADP^+ est réprimée par le glutamate quand le glucose est présent, résultat observé chez les souches BrBv IV et 1135 où la synthèse de cette enzyme est plus faible sur glucose et saccharose.

Nos résultats vont donc permettre d'établir un schéma général à l'accumulation de l'acide α -cétoglutarique. Dans les premières heures de croissance, l' α -cétoglutarate provenant de l'action de l'isocitrate déshydrogénase est réduit en glutamate par le glutamate déshydrogénase NADP^+ .

Planche 22 : Evolution de l'activité enzymatique de la glutamate déshydrogénase NADH dépendante ----- et NADPH dépendante ———— relevée sur des broyats mycéliens de la souche BrBv IV cultivée sur maltose, glucose, saccharose et acétate de sodium.

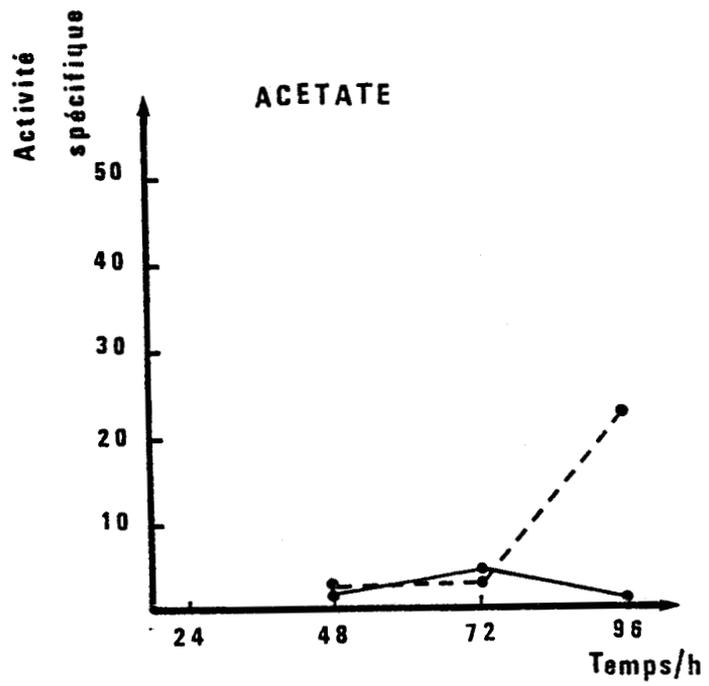
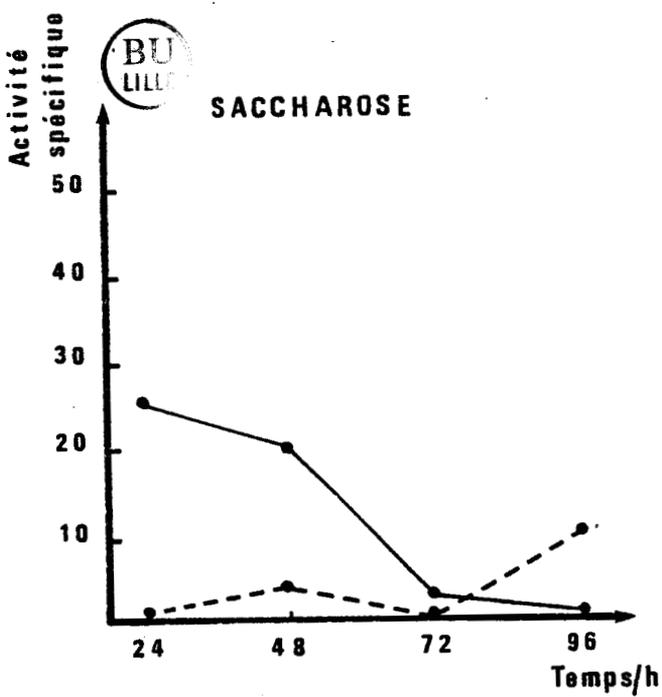
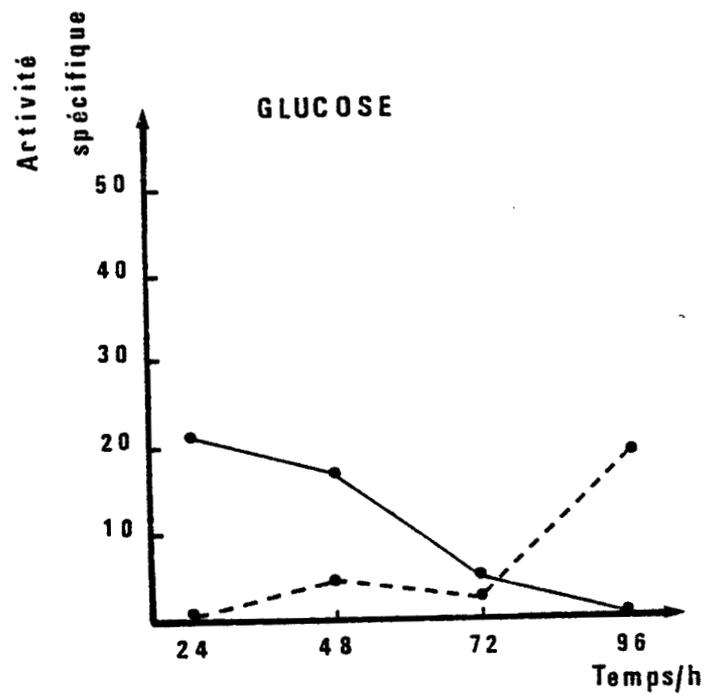
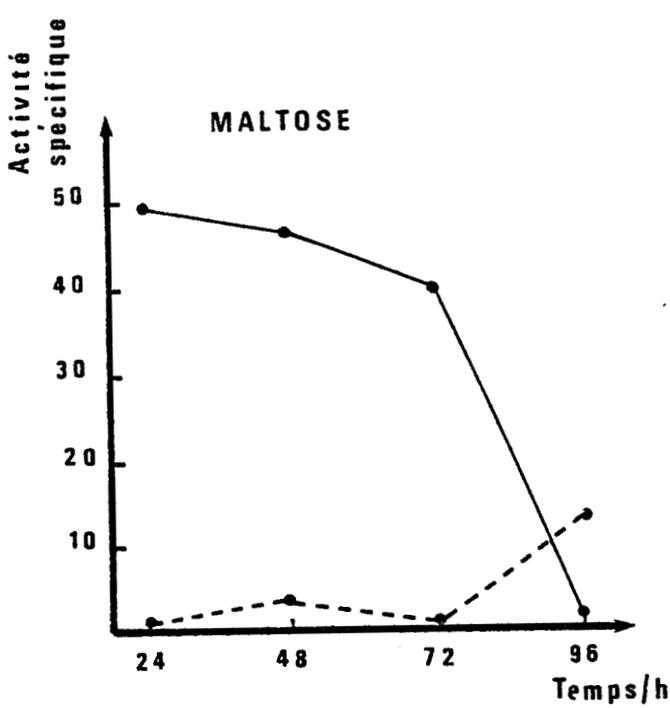
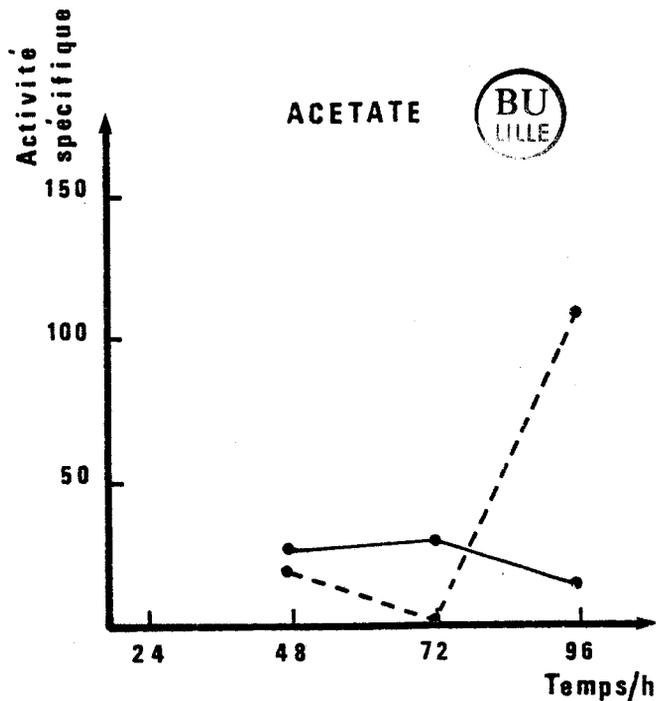
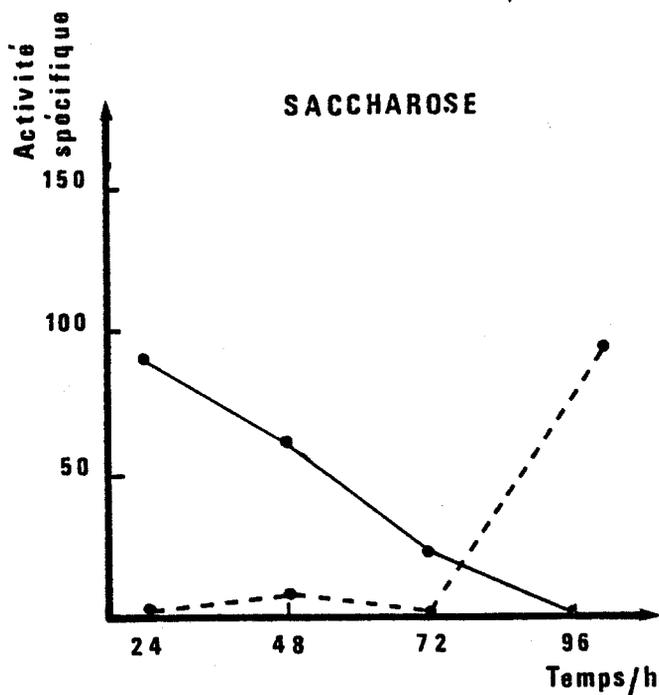
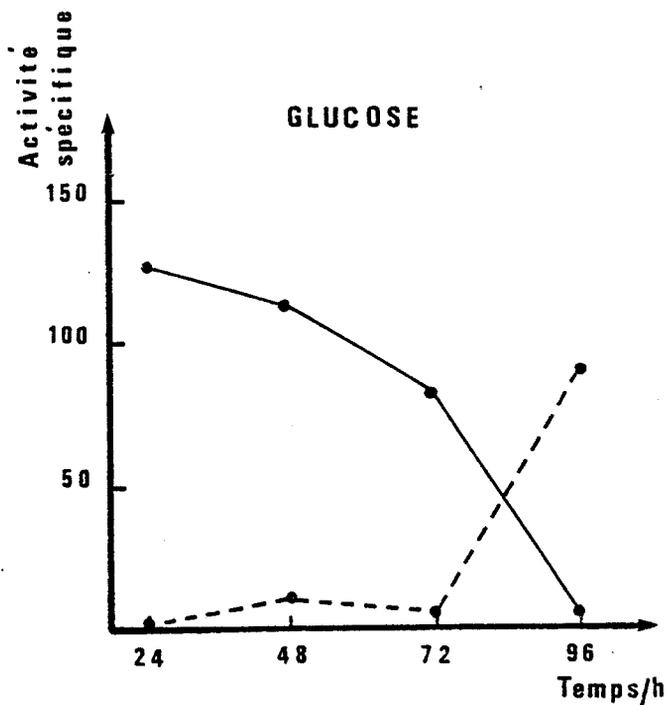
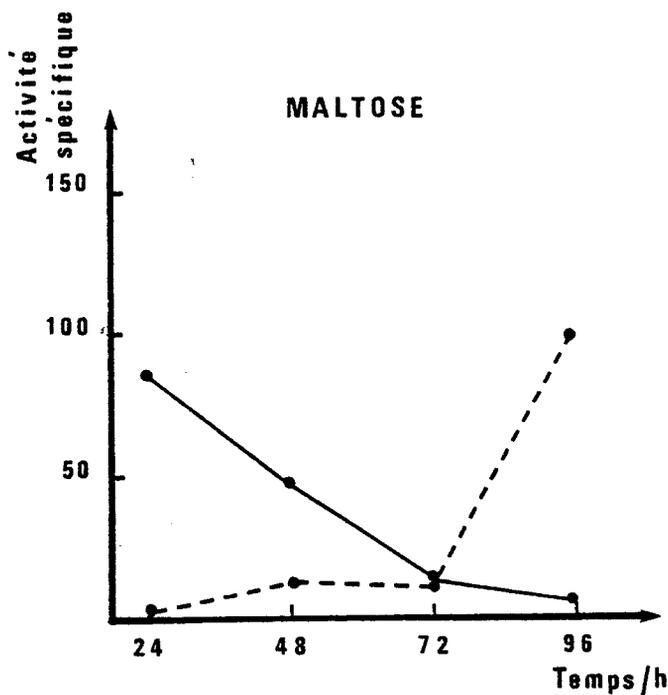


Planche 23: Evolution de l'activité enzymatique de la glutamate déshydrogénase NADH dépendante ----- et NADPH dépendante _____ relevée sur des broyats mycéliens de la souche 1135 cultivée sur maltose, glucose, saccharose et acétate de sodium.



A cet égard, nos résultats font apparaître une certaine relation entre ces deux activités puisque c'est sur la souche 1135, qui présente les activités isocitrate déshydrogénase les plus élevées, que nous avons relevé les activités glutamate déshydrogénase NADP^+ les plus importantes.

En fin de croissance, et pour les raisons citées plus haut l'activité de cette enzyme va chuter progressivement entraînant l'accumulation de l'acide α céto-glutarique.

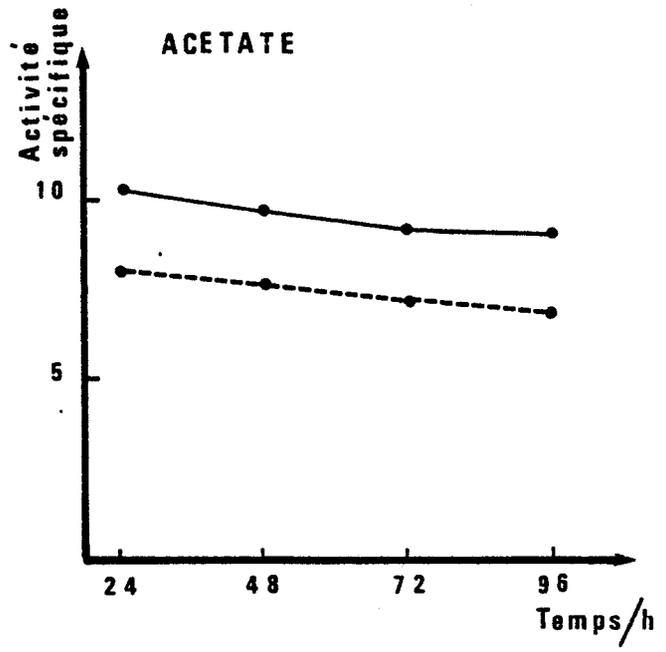
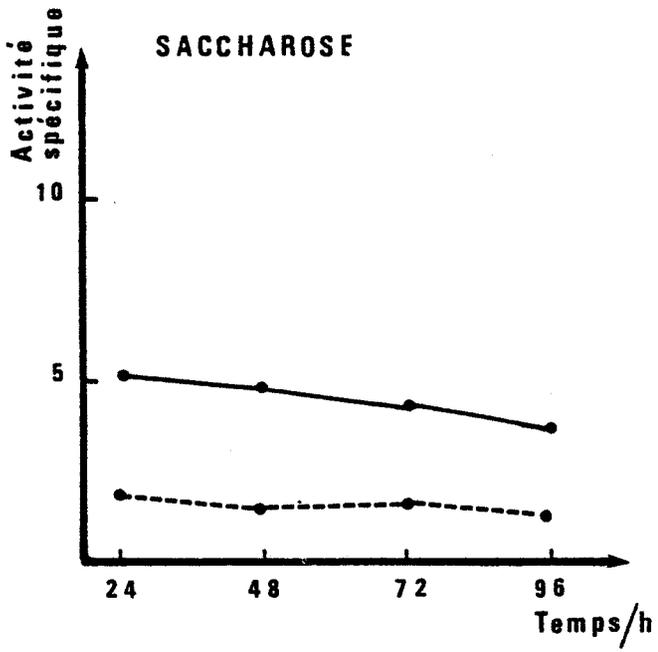
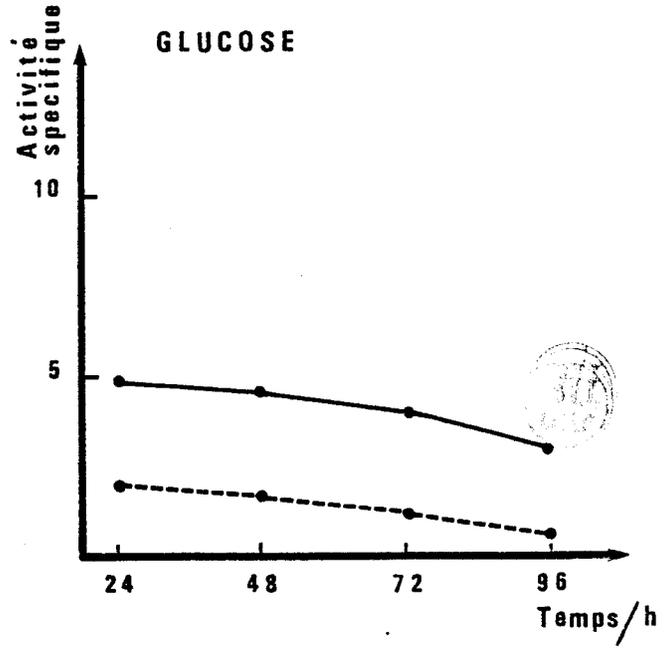
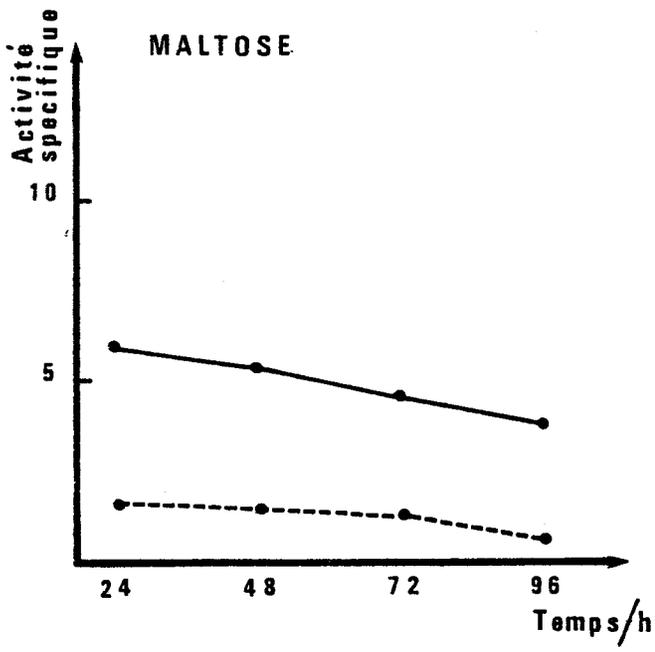
Cette accumulation sera d'autant plus importante qu'à cette période l'assimilation pratiquement totale du substrat carboné déréprime l'activité NAD^+ dépendante. A noter toutefois que celle-ci ne semble jouer un rôle quantitatif qu'après 72 heures, période où, rappelons-le, les concentrations d'acide malique dans les filtrats de culture sont à nouveau en hausse. Or, nous avons montré que l'isocitrate déshydrogénase est une enzyme réversible capable de carboxyler l' α -céto-glutarate en isocitrate qui, via le cycle glyoxylique, pleinement dérépressé à cette période, pourrait être à l'origine de ce surcroît d'acide malique présent après 72 heures de culture.

Si désormais le mécanisme responsable de l'accumulation des acides α -céto-glutarique et malique en fin de croissance apparaît assez clair, les processus impliqués dans le rejet d'acide malique observé à 48 h restent obscurs. N'ayant pu trouver au niveau du cycle de Krebs un schéma capable d'expliquer ce phénomène, nous avons recherché dans les voies annexes les mécanismes impliqués dans cette accumulation.

7 - ACTIVITÉ ENZYME MALIQUE

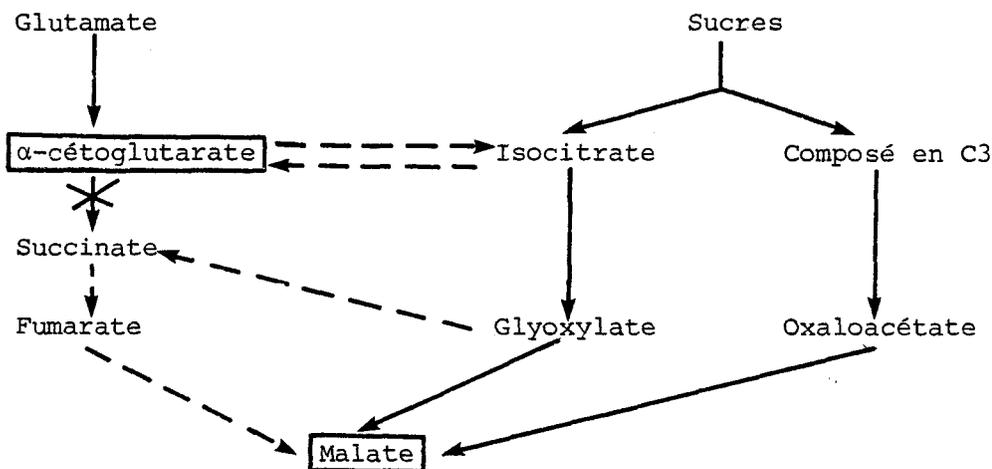
En tout premier lieu, nous avons abordé l'étude de l'enzyme malique (planche 24). Cette enzyme semble avoir comme fonction principale la production de NADPH et le catabolisme de l'acide malique (SCRUTTON, 1971), fait accrédité par l'observation de la planche 24 qui montre des activités supérieures pendant la croissance des souches sur acétate, où l'activité de la chaîne HMP ne peut subvenir aux besoins cellulaires en NADPH . Comme il semble que cette enzyme ne puisse être impliquée dans la fixation du dioxyde de carbone (SMITH, 1976), les activités constamment supérieures observées chez la souche BrBv IV pourraient faciliter le catabolisme de l'acide malique chez cet organisme, alors que chez 1135 son activité réduite favoriserait l'accumulation de l'acide malique. *In vivo*, cette activité sera d'autant plus réduite chez la souche 1135 que d'une part le taux de NADPH y est élevé et que d'autre part l'activité de cette enzyme est régulée par le 6-P-gluconate, composé issu de la chaîne HMP, particulièrement active chez cette souche.

Planche 24: Evolution de l'activité enzymatique de l'enzyme malique relevée sur des broyats mycéliens de la souche BrBv IV et 1135 - - - - cultivées sur maltose, glucose, saccharose et acétate de sodium.



Cependant, nous ne sommes toujours pas en mesure d'expliquer les raisons profondes de l'accumulation de l'acide malique ; l'enzyme malique peut certes favoriser cette accumulation, mais elle ne peut en aucun cas justifier de sa production.

Avant de poursuivre plus avant ce travail, il nous a paru souhaitable de résumer l'état de nos connaissances concernant l'accumulation des acides organiques.



L'activité de l'α-cétoglutarate déshydrogénase étant déficiente, l'équilibre $\text{glutamate} \rightleftharpoons \alpha\text{-cétoglutarate}$ apparaît bien comme l'étape déterminante dans l'accumulation de l'acide α-cétoglutarique. Dans les premières heures de culture, l'α-cétoglutarate résultant de l'activité isocitrate déshydrogénase est assimilé *via* notamment la glutamate déshydrogénase NADP^+ dépendante, alors qu'en fin de croissance la répression de cette activité, associée à la dérèglement de la glutamate déshydrogénase NAD^+ dépendante entraîne son accumulation. Une partie de cet α-cétoglutarate peut alors être carboxylé en isocitrate entraînant de ce fait une faible accumulation d'acide malique en fin de croissance.

Dans les premières heures de croissance, l'isocitrate issu des composés glycolytiques peut également, par l'intermédiaire du shunt glyoxylique, participer à l'accumulation de l'acide malique mais nous avons vu que ce phénomène ne pouvait être que limité.

La majorité de l'acide malique relargué après 48 h de culture proviendrait d'une réduction de l'oxaloacétate par la malate déshydrogénase.

La fin de ce chapitre va donc porter sur l'étude des voies anaplerotiques à la glycolyse responsables de la synthèse de l'oxaloacétate ainsi que des facteurs à l'origine d'une telle orientation métabolique.

III - ETUDE DES ACTIVITES RESPIRATOIRES

1 - ACTIVITÉ NADH OXYDASE ET NADH CYTOCHROME C OXYDOREDUCTASE

L'oxydation du NADH en aérobiose au niveau cellulaire est prise en charge par les mitochondries, or la biochimie nous enseigne que les nucléotides du type NAD (P) ne peuvent franchir la membrane interne mitochondriale ; ainsi l'oxydation du NADH exogène passe par la réduction temporaire d'un substrat tel que l'oxaloacétate qui, réduit en malate, peut alors passer à travers cette membrane interne grâce à un transporteur spécifique. Le malate est ensuite réoxydé en oxaloacétate fournissant ainsi une molécule de NADH qui s'engagera dans la chaîne respiratoire. Il s'agit là d'un exemple de transporteur. Plus généralement on connaît des transporteurs d'acides dicarboxyliques, d'acides tricarboxyliques, d'acides gras, d' α -céto-glutarate, de glutamate, de phosphate, d'ADP et d'ATP.

Nous savons aussi que les mitochondries de champignons, et notamment d'*A. oryzae* (WATSON et coll., 1969), sont capables d'oxyder directement le NADH cytoplasmique ; nous avons étudié cette fonction sur des extraits bruts (broyage à l'ultra turrax) et sur des mitochondries isolées suivant la technique énoncée dans l'annexe technique n° 5.

Nous avons mis en évidence chez *A. oryzae* deux enzymes mitochondriales capables d'oxyder le NADH exogène : le NADH oxydase et le NADH cytochrome c oxydoréductase. La comparaison entre les activités présentes dans les extraits bruts et dans les mitochondries montre une activité spécifique de 3 à 6 fois supérieure dans le culot mitochondrial, tendant ainsi à démontrer que ces deux enzymes sont bien portées par les mitochondries (tableau 9).

Les résultats des planches 25 et 26 font apparaître que par rapport à la souche BrBv IV les mitochondries de la souche 1135 disposent dans les premières 48 h de croissance d'une capacité inférieure à réoxyder le NADH exogène, ce qui doit être rapproché du dosage intramycélien des coenzymes oxydés et réduits où la souche 1135 présentait pendant ce laps de temps des rapports NADH/NAD les plus élevés.

Planche 25 : Evolution de l'activité enzymatique de l'*NADH* oxydase relevée sur des broyats mycéliens des souches BrBv IV ——— et 1135 - - - - cultivées sur maltose, glucose, saccharose et acétate de sodium.

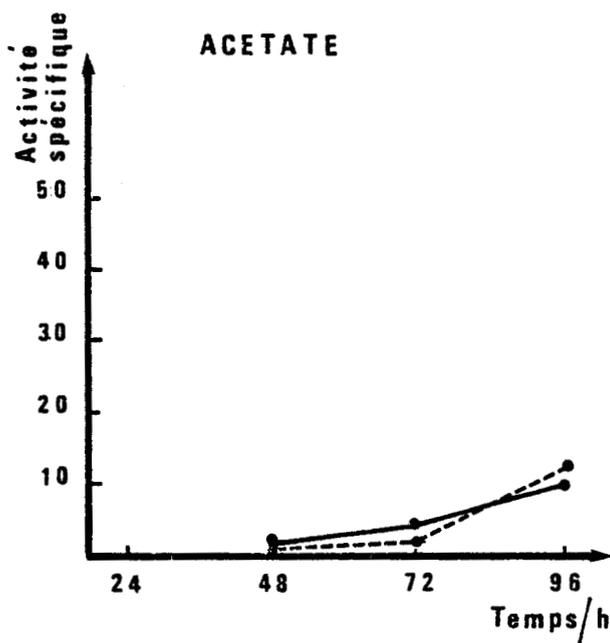
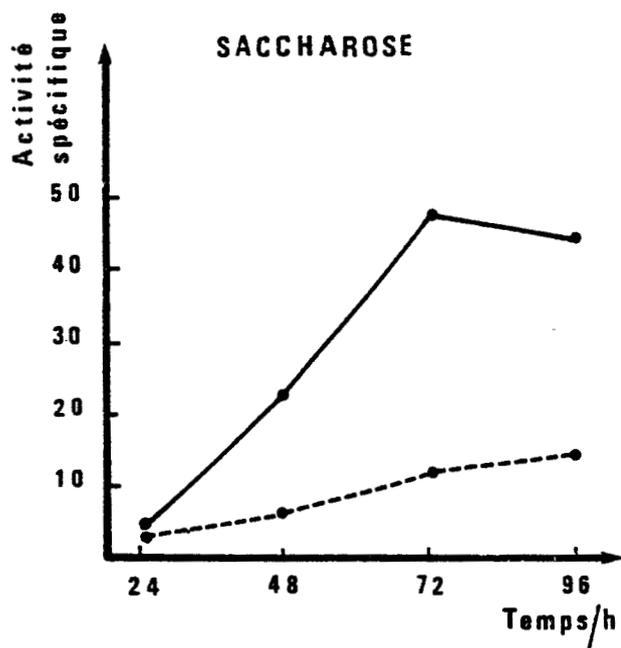
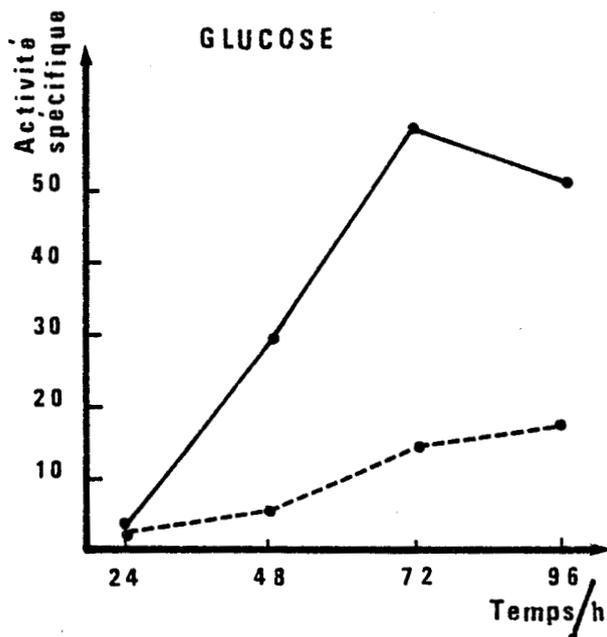
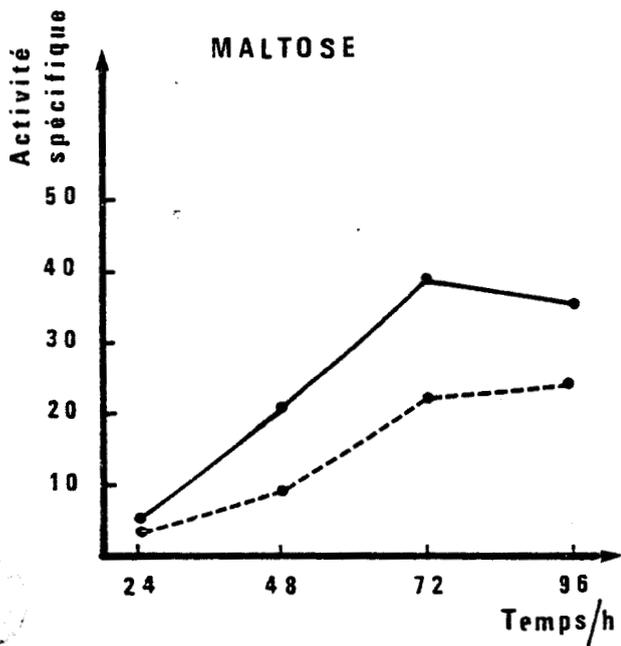


Planche 26 : Evolution de l'activité enzymatique de l'*NADH* cytochrome *c* oxydoréductase relevée sur des broyats mycéliens des souches BrBv IV ——— et 1135 - - - - cultivées sur maltose, glucose, saccharose et acétate de sodium.

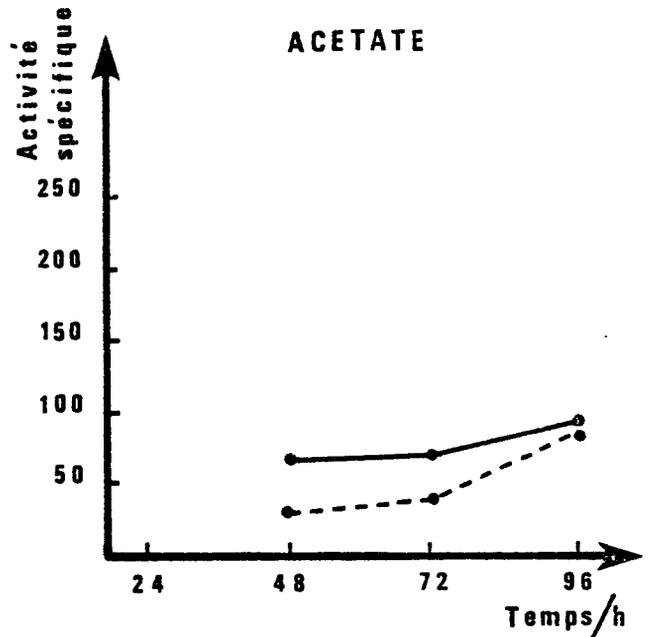
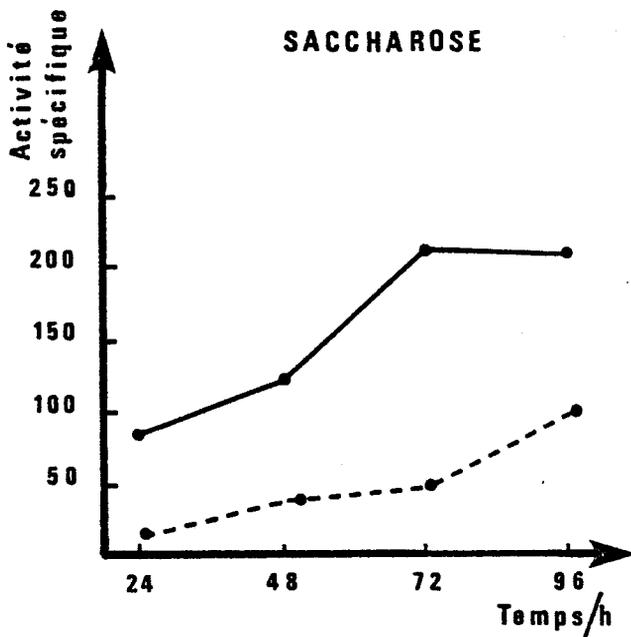
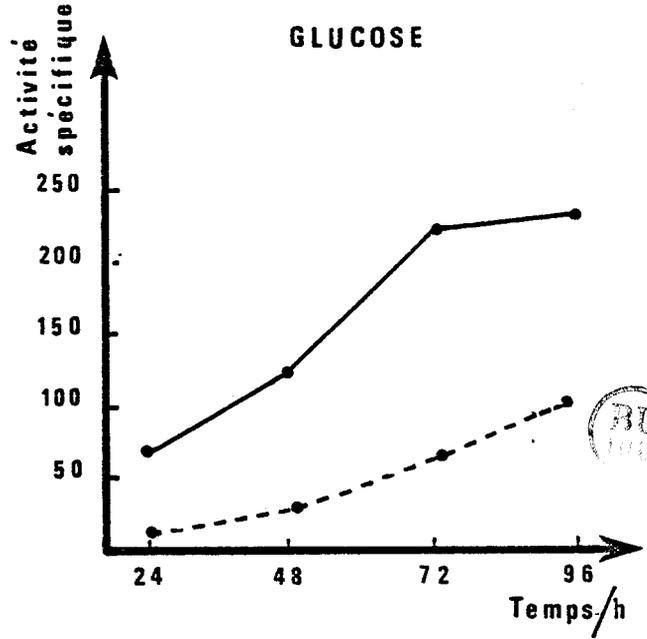
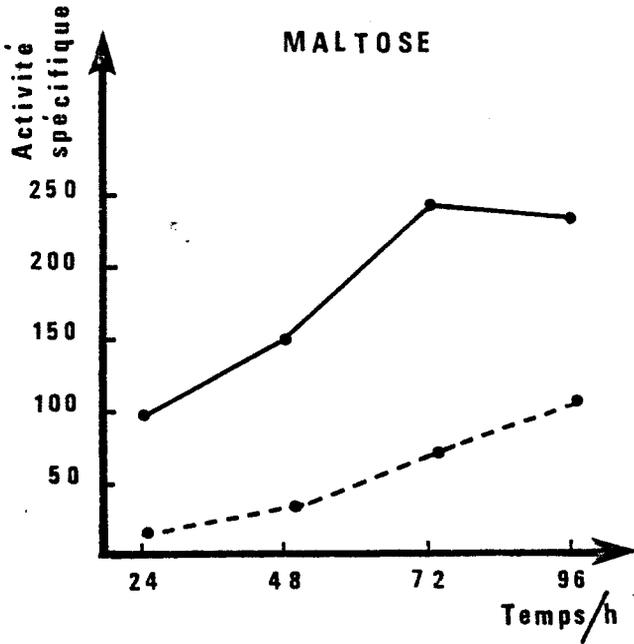


Tableau 9 : Activités de la NADH oxydase et de la NADH cytochrome c oxydoréductase relevées dans les fractions d'un broyat mycélien des souches BrBv IV et 1135 cultivées 72 heures sur maltose.

Souche	Fraction	Activité NADH oxydase		Activité NADH cytochrome c oxydoréductase	
		Spécifique	Totale*	Spécifique	Totale*
BrBv IV	Extrait brut	45	15 784	249	87 316
	Culot mitochondrial	278	6 449	747	17 330
	Surnageant	0,23	80	14	4 909
1135	Extrait brut	24	7 715	78	25 089
	Culot mitochondrial	108	1 879	319	5 551
	Surnageant	0	0	1,8	578

* ramenée à la concentration totale des protéines dans la fraction.

L'étude de l'isocitrate déshydrogénase nous a démontré l'action déterminante jouée par les coenzymes sur l'orientation du métabolisme intermédiaire. Ainsi, HARDING et coll. (1970) ont montré que le complexe enzymatique pyruvate déshydrogénase était régulé par le NADH et l'acétyl CoA. Outre un point de jonction important entre la glycolyse et le cycle de Krebs, cette réaction constitue une des voies principales de l'anabolisme de l'acétyl CoA. Selon nous, l'accumulation de NADH chez la souche 1135 pourrait entraîner l'inhibition de ce complexe enzymatique, favorisant d'une part une déficience intramycélienne en acétyl CoA et, d'autre part, entraîner la carboxylation de composés en C3 issus de la glycolyse en oxaloacétate. Trois enzymes peuvent être responsables de cette carboxylation : la phosphoénolpyruvate carboxykinase, la phosphoénolpyruvate carboxylase et la pyruvate carboxylase.

Dans un premier temps, nous avons étudié la phosphoénolpyruvate carboxykinase en utilisant la technique de FLAVELL et FINCHAM (1968) sans toutefois obtenir de résultats reproductibles. Il semblerait, selon PEREA et GANCEDO (1982), que des activités parasites, comme la pyruvate kinase, interfèrent dans les résultats. Il reste cependant que selon SCRUTTON (1971) cette activité serait principalement décarboxylatrice et ne pourrait donc pas être impliquée dans la carboxylation des composés en C3.

La phosphoénolpyruvate carboxylase qui, elle, a une fonction carboxylatrice (SCRUTTON et YOUNG, 1972) serait absente chez les champignons filamenteux (CASSELTON, 1976).

Reste la pyruvate carboxylase dont la régulation semble varier avec l'espèce étudiée. Ainsi, COOPER et BENEDICT (1968) chez *Saccharomyces*, OSMANI et SCRUTTON (1981) chez *A. nidulans* ont montré que cette enzyme était inhibée pour l'acétyl CoA alors que pour FEIR et SUZUKI (1969) chez *A. niger* et BEEVER (1973) chez *N. crassa* elle n'était pas affectée par ce composé.

Quelque soit l'enzyme responsable du shunt de la pyruvate déshydrogénase, toutes trois ont comme composé commun l'oxaloacétate, or nous savons qu'au niveau du cycle de Krebs seul la malate déshydrogénase s'est révélée susceptible de l'assimiler. De cette façon l'organisme pourrait utiliser cette réaction pour régénérer le NADH cytoplasmique, l'accumulation de l'acide malique serait alors une résultante d'un déficit cellulaire en NAD^+ .

Si ce modèle d'accumulation convient très bien à la souche 1135, il ne peut justifier de l'accumulation de l'acide malique observée chez BrBv IV cultivée sur glucose et saccharose, puisque dans ces conditions de culture nous avons relevé *in vitro* des activités NADH oxydase et NADH cytochrome c oxydoréductase similaires aux activités enregistrées sur maltose et donc en théorie suffisantes pour oxyder le NADH exogène sans emprunter massivement les transporteurs spécifiques.

Ces résultats sont donc en conflit apparent avec notre hypothèse qui veut qu'une accumulation d'acides organiques soit la conséquence directe d'une déficience de ces systèmes d'oxydation de NADH exogène.

2 - ÉTUDE DE LA RESPIRATION DES SOUCHES BRBv IV ET 1135

Pour lever cette contradiction, nous avons étudié *in vivo* la respiration des deux souches sur les substrats concernés (annexe technique n° 6). L'étude du tableau 10 montre à l'évidence l'effet répressur du glucose sur les voies respiratoires. Cet effet, connu sous le nom d'effet Crabtree, fut découvert en 1929 par l'observation sur des cellules cancéreuses d'un taux glycolytique excessif comparé aux activités respiratoires correspondantes. La répression du glucose sur la respiration fut démontrée comme étant à la base de cet effet.

Tableau 10 : Respiration des souches BrBv IV et 1135
relevée sur glucose et maltose.

Souche	Substrat	Temps d'incubation	$\mu\text{l O}_2$ consommé	$\mu\text{l CO}_2$ excrété	Q.R.
BrBv IV	Maltose	15'	3,14	3,11	0,98
		30'	6,67	5,79	0,86
		45'	10,58	8,83	0,83
	Glucose	15'	1,52	1,12	0,72
		30'	3,30	2,29	0,69
		45'	4,96	3,42	0,65
1135	Maltose	15'	3,63	1,81	0,49
		30'	6,99	3,78	0,54
		45'	11,43	5,43	0,47
	Glucose	15'	2,86	1,51	0,53
		30'	5,81	2,84	0,49
		45'	8,52	3,84	0,44

Si on sait aujourd'hui que cet effet est notamment à l'origine de la production en aérobiose d'éthanol chez *Saccharomyces cerevisiae* cultivé sur glucose (FIECHTER et coll., 1981), son mécanisme reste mal connu ; pour certains auteurs comme PETERKOFISKY (1977), il s'agit d'un contrôle des concentrations intracellulaires de l'AMPc par les systèmes transporteurs de sucre ; pour d'autres comme HOLZER (1976), cet effet serait principalement contrôlé par le turnover protéinique ; on parle alors d'inactivation catabolique, par opposition à la répression catabolique.

Quelqu'en soit la cause, l'effet Crabtree entraîne chez la souche BrBv IV une perte de plus de 50% dans la consommation d'oxygène, favorisant ainsi les processus anaérobies de régénération du NADH. Parmi ceux-ci, la réduction de l'oxaloacétate en malate associée à la carboxylation du phosphoénolpyruvate apparaît comme la plus probable, puisque d'une part la souche BrBv IV accumule dans ces conditions l'acide malique, et que d'autre part le Q.R. passe de 0,89 sur maltose à 0,65 sur glucose. Cette diminution des rejets de CO_2 étant interprétée comme une conséquence de la carboxylation du phosphoénolpyruvate.

En fonction de ces résultats il était intéressant de déterminer si les faibles accumulations d'acide malique enregistrées chez la souche BrBv IV cultivée sur maltose étaient, elles aussi, dues à l'effet Crabtree. Rappelons que dans le chapitre I nous avons montré que l' α -glucosidase induisait à partir de ce substrat des concentrations de glucose allant de 15 à 30%, après respectivement 48 et 72 heures de culture. Nous avons alors tenté, en plaçant du mycélium de 48 heures dans des solutions maltosées renfermant des concentrations croissantes de glucose, de déterminer si après 2 heures d'incubation on décelait la présence d'acide malique, ce que notre technique n'a pas permis.

Nous avons recommencé le même type d'expérience avec du mycélium de 17 heures, dont nous avons étudié la respiration en présence d'un milieu maltosé à 15% de glucose. Les résultats du tableau 11 montrent que de telles concentrations suffisent à induire une répression des voies respiratoires, conduisant à penser que l'effet Crabtree est bien à la base de l'accumulation de l'acide malique chez la souche BrBv IV, associé toutefois en fin de croissance au catabolisme du glutamate.

Tableau 11 : Influence du glucose sur la respiration de la souche BrBv IV.

Souche	Substrat	Temps d'incubation	$\mu\text{l O}_2$ consommé	$\mu\text{l CO}_2$ excrété	Q.R.
BrBv IV	Maltose 100%	15'	3,21	3,14	0,97
		30'	6,65	5,86	0,88
		45'	10,41	8,84	0,85
	Maltose 85% Glucose 15%	15'	3,08	2,92	0,94
		30'	6,20	5,28	0,85
		45'	9,65	7,92	0,82

Les échanges gazeux relevés dans le tableau 10 de la souche 1135 ont montré qu'elle aussi est sensible à l'effet Crabtree, bien que celui-ci ne puisse être à l'origine de l'accumulation de l'acide malique puisque cette accumulation se produit aussi bien sur maltose seul, où le taux respiratoire atteint une valeur assez proche de celui de la souche BrBv IV cultivée dans les mêmes conditions. Sans une étude approfondie de la phosphorylation oxydative, nous ne pouvons tirer de conclusion de ces consommations d'oxygène similaires chez les deux souches, puisque nous savons comme WATSON l'a montré (1967, 1969) chez *A. niger* et *A. oryzae*, que le taux respiratoire et le rapport ADP/O dépend de la nature du substrat utilisé par les mitochondries.

Nous nous reporterons donc sur les rejets carboniques qui, sans conteste, montrent la particularité des deux souches. Cette particularité est de plus accentuée par le fait que la souche 1135 emprunte massivement la chaîne des hexoses monophosphates, or une telle participation de cette chaîne au catabolisme d'un substrat entraîne des Q.R. supérieurs à 1 (SIEBERT et SCHULZ, 1979).

A nouveau, la carboxylation du phosphoénolpyruvate, conséquence d'un rapport cytoplasmique NADH/NAD excessif, nous apparaît comme la réponse la plus probable à ces observations.

3 - RECHERCHE D'UNE FERMENTATION ÉTHANOLIQUE

Nous avons pensé que parallèlement à la réduction de l'oxaloacétate, les deux souches pouvaient développer d'autres processus pour régénérer l'NADH cytoplasmique. Nous avons successivement envisagé la fermentation lactique et la fermentation éthanolique.

Le premier processus semble à écarter puisque les résultats du chapitre I n'ont pas fait état d'une présence d'acide lactique dans les filtrats de culture. Pour étudier le second processus, nous avons recherché les traces d'une éventuelle accumulation d'éthanol dans ces filtrats. Annexe technique n°8.

Tableau 12 : Evolution des concentrations d'éthanol présentes dans les filtrats de culture des souches BrBv IV et 1135 cultivées sur maltose et glucose.

Souche	BrBv IV				1135			
	24	48	72	96	24	48	72	96
Temps de culture (h)								
Maltose	20	66	242	121	20	90	446	259
Glucose	34	333	629	174	38	340	592	236

Résultats exprimés en mg d'éthanol l⁻¹ g⁻¹ poids sec de mycélium.

Comme le montre le tableau 12, les deux souches cultivées sur maltose et glucose excrètent à des degrés divers de l'éthanol. Dans toutes les conditions étudiées, l'optimum d'accumulation de ce composé se situe entre 48 et 72 heures, c'est-à-dire dans une période où le substrat est encore très présent et où la masse mycélienne devient importante. A la faveur de ces deux éléments, il pourrait se développer dans les fioles de culture des conditions d'anaérobiose favorisant une fermentation alcoolique.

4 - INFLUENCE DE L'AÉRATION DES MILIEUX DE CULTURE SUR L'ACCUMULATION DES ACIDES ORGANIQUES ET SUR LA PRODUCTION D' α -AMYLASE

Puisqu'il semble acquis que l'accumulation d'acides résulte d'un problème d'oxydation cellulaire, nous avons pensé qu'en favorisant les échanges gazeux dans les milieux de culture par l'emploi de fioles à contre-pales, nous favoriserions du même coup la diminution des rejets d'acide malique et, en contre partie, l'augmentation de la production d' α -amylase, objectif qui n'a pas été atteint, comme le montrent les planches 27 et 28.

L'aération des milieux de culture favorise avant tout la croissance, puisque le poids de matière sèche augmente pour la souche BrBv IV de 43% et de 46% pour la souche 1135 ; ramenée au poids de matière sèche, la production d' α -amylase à 96 heures chute de 60% pour la souche BrBv IV et de 12% pour la souche 1135. La production d'acide malique, quant à elle, toujours par gramme de matière sèche, chute de 83% chez la souche 1135, alors que chez la souche BrBv IV elle ne tombe que de 30% de sa valeur initiale sur milieu maltosé témoin, après 48 heures de culture.

Aussi, loin de favoriser la synthèse d' α -amylase, l'aération des milieux de culture diminue au contraire cette production au profit de la biomasse. Un point positif pourtant, qui montre l'importance jouée par les voies respiratoires dans l'accumulation de l'acide malique, est la nette répression de cette synthèse chez la souche 1135 et de façon moins sensible chez la souche BrBv IV.

Nous avons voulu savoir si, au niveau de métabolisme intermédiaire, ces résultats s'appuyaient sur une modification physiologique des enzymes-clefs de ce métabolisme (tableau 13).

Planche 27 : Croissance, évolution du pH, synthèse d' α amylase, production d'acides organiques et concentrations résiduelles en maltose et glutamate de la souche BrBv IV cultivée en milieu maltose aéré.

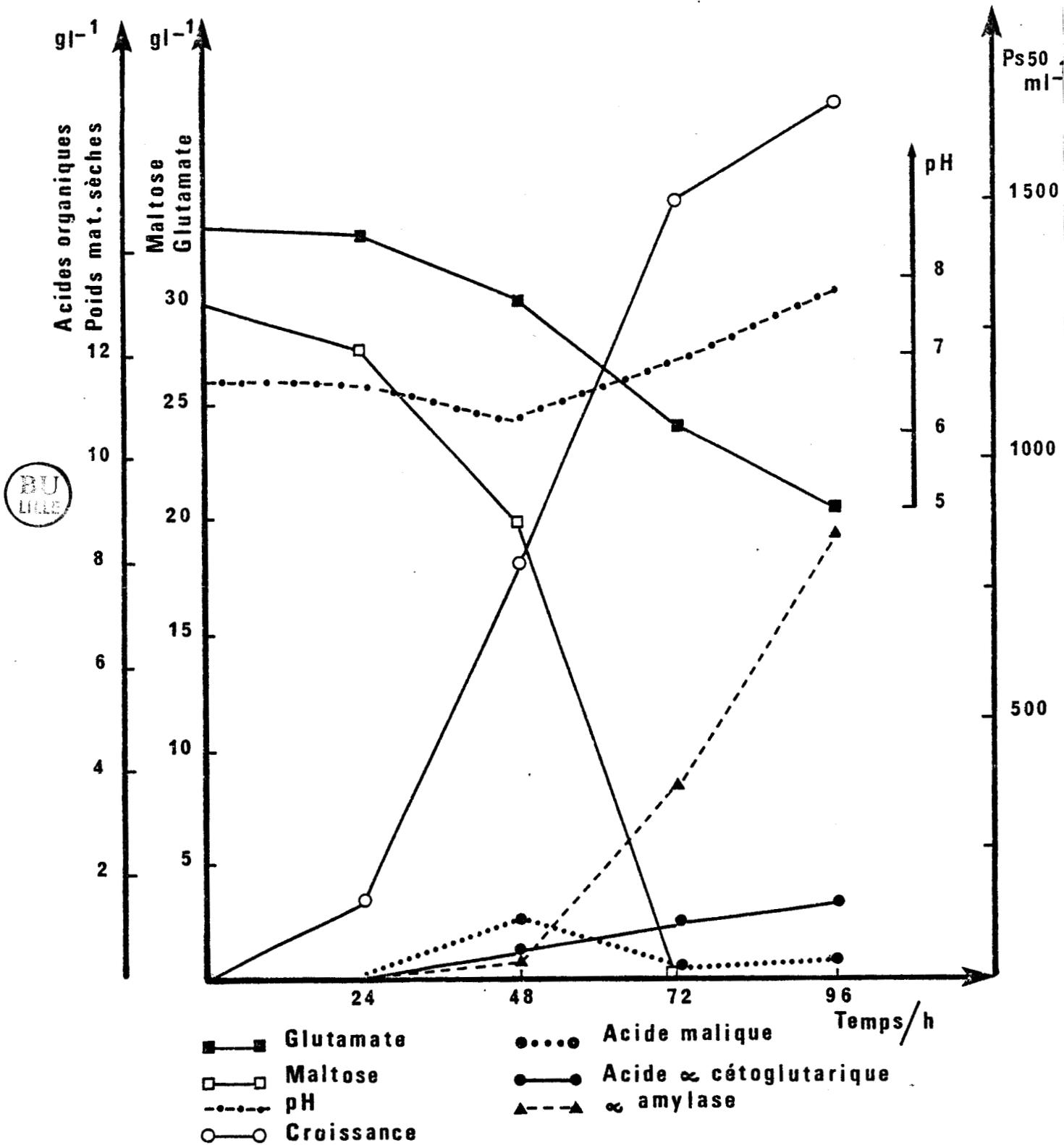


Planche 28 : Croissance, évolution du pH, synthèse d' α -amylase, production d'acides organiques et concentrations résiduelles en maltose et glutamate de la souche 1135 cultivée en milieu maltose aéré.

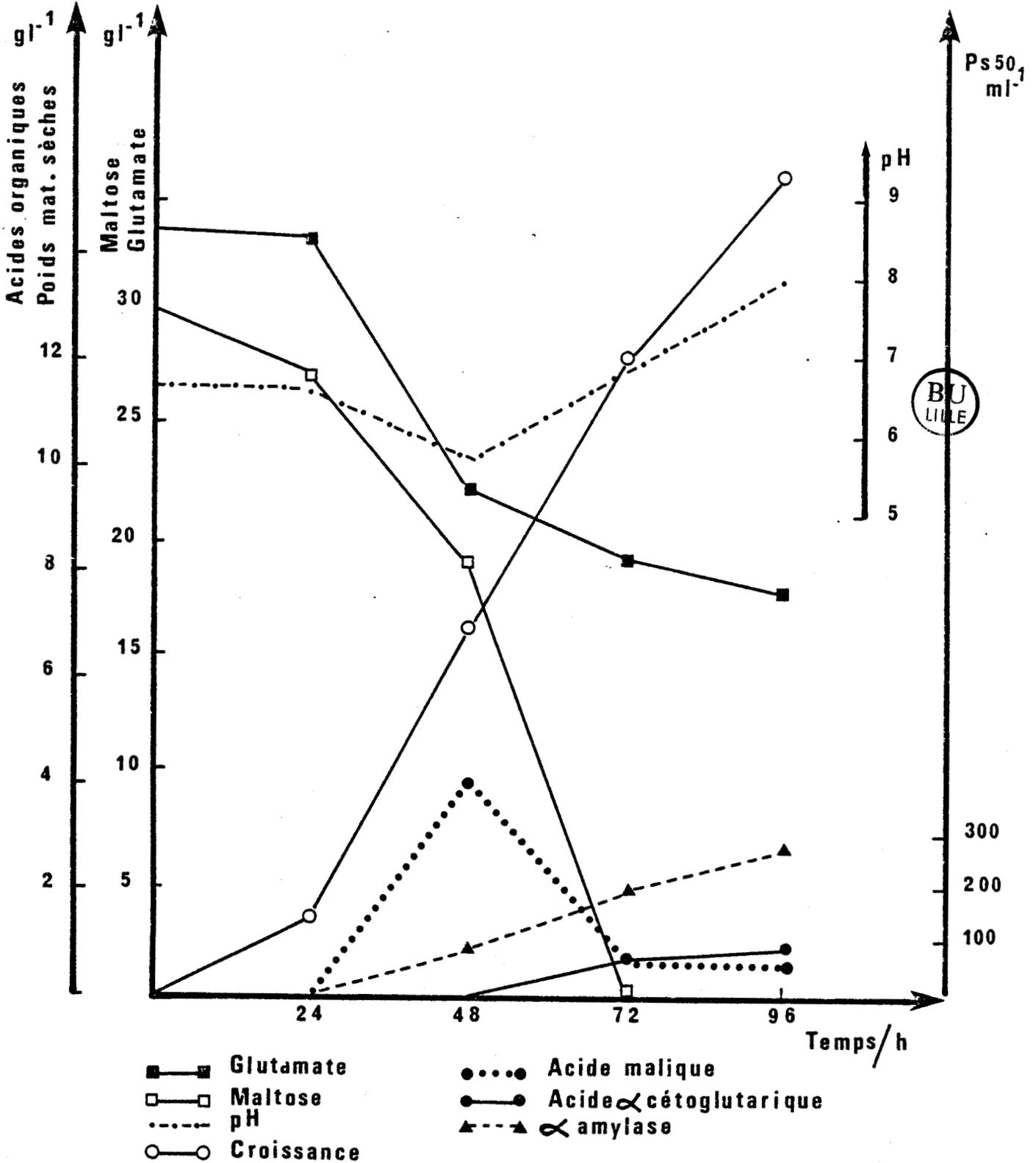


Tableau 13 : Activités spécifiques de cinq enzymes du métabolisme intermédiaire relevées sur des broyats mycéliens des souches BrBv IV et 1135 cultivées sur milieu maltose en fiole d'un litre avec et sans contre-pales.

Activité enzymatique	Souche	BrBv IV				1135			
	Temps de culture	24	48	72	96	24	48	72	96
Glucose-6-P déshydrogénase	milieu témoin	46,7±1,25	64,5±2,3	60,2±3,1	58,4±1,8	67±3,1	115,2±6,3	57,4±3,2	61,1±2,8
	milieu aéré	136,9±6,2	210,3±9,1	188,5±7,9	181,7±11,2	114±5,2	232,8±12	160,3±6,7	195,4±4,5
Aldolase	milieu témoin	27,2±3,1	52,6±5,4	65,7±4,9	70,3±6,5	2,9±0,06	6,4±0,12	16,4±0,36	24,8±0,16
	milieu aéré	114 ±10,5	232±12,3	160,3±8,3	195,4±12,1	48±1,8	92±2,5	110±4,3	164 ±6,6
Isocitrate déshydrogénase	milieu témoin	0,4 ±0,07	4,2 ±0,31	2,2 ±0,11	7,2 ± 0,22	18,3±1,2	46 ± 2,1	15,1 ±0,7	22,4 ±1,3
	milieu aéré	0,9 ±0,02	7,3 ±0,12	5,4 ±0,28	18,5 ±0,71	24,7±0,6	68,1 ±4,1	21 ±0,25	49,4 ±2,9
Isocitratase	milieu témoin	-	1,35 ±0,06	2,17 ±0,1	11,41 ±0,61	-	6,7 ±0,42	4,9 ±0,25	42 ± 1,4
	milieu aéré	-	3,1 ±0,08	7,9 ±0,42	35,2 ±1,3	0,2±0,002	9,7 ±0,36	17,1±0,69	73,6±4,1
Enzyme malique	milieu témoin	5,3 ±0,21	4,7 ±0,33	4,1 ±0,16	3,6 ±0,28	1,5 ±0,09	1,3 ±0,06	1,1 ±0,03	0,48±0,002
	milieu aéré	4,3 ±0,3	4,2 ±0,11	3,7 ±0,21	4,3 ±0,15	3,8 ±0,43	2,7 ±0,12	2,9 ±0,24	1,7 ±0,03

A l'augmentation de la biomasse, associée à l'assimilation plus rapide du substrat, correspond une augmentation des activités glucose-6-P déshydrogénase et aldolase dont l'équilibre paraît modifié par l'aération des milieux de culture ; chez la souche BrBv IV cet équilibre est déplacé vers la chaîne HMP, alors que chez la souche 1135 au contraire, c'est l'aldolase, donc *a priori* l'EMP, qui apparaît comme la principale bénéficiaire de l'aération, l'équilibre restant toutefois en faveur de l'HMP.

Au niveau du cycle de Krebs, l'activité isocitrate déshydrogénase subit elle aussi l'action positive de l'aération, bien que cette activité chez la souche BrBv IV semble toujours répressée ; de même l'isocitratase, enzyme glyoxylique dont l'activité nulle à 24 heures croît d'autant plus vite que le substrat s'épuise rapidement dans ces conditions d'aération.

Cette augmentation d'aération détermine d'autres modifications du métabolisme : ainsi chez la souche BrBv IV l'activité de l'enzyme malique diminue sensiblement, alors que chez la souche 1135 au contraire, elle augmente de 50%. Si l'un des rôles de l'enzyme malique est bien la formation d'*NADH*, peut-être peut-on rapprocher de ces résultats les modifications enregistrées dans le rapport des voies HMP/EM. Un déplacement d'équilibre vers la voie des hexoses monophosphates signifiera pour la souche BrBv IV une production accrue de *NADPH*, alors qu'un déplacement d'équilibre vers la voie d'Embden-Meyerhof aura, lui, pour conséquence, une synthèse accrue de *NADH* chez la souche 1135.

Connaissant le rôle capital joué par ce dernier coenzyme dans l'accumulation de l'acide malique, il peut paraître étonnant que la souche 1135 trouve le besoin de favoriser sa synthèse. Nous avons donc étudié avec intérêt les deux enzymes mitochondriales précurseurs de la chaîne respiratoire responsable de son oxydation exogène.

Tableau 14 : Activités spécifiques de NADH oxydase et de NADH cytochrome c oxydoréductase relevées sur des broyats mycéliens des souches BrBv IV et 1135 cultivées sur milieu maltose en fiole d'1 litre avec ou sans contre-pales.

Activité enzymatique	Souche	BrBv IV				1135			
		Temps de culture (h)							
		24	48	72	96	24	48	72	96
NADH oxydase	milieu témoin	5,5±0,27	21,2±1,3	39,4±2,8	36,7±1,2	3,8±0,12	9,1±0,52	23,5±1,5	24,7±0,95
	milieu aéré	8,3±0,48	26,1±0,91	37,5±1,6	49,7±2,3	15±0,68	27,6±1,3	41,8±2,2	72,4±3,7
NADH cytochrome c oxydoréductase	milieu témoin	98,4±4,1	135,2±5,4	231±12,6	221,7±7,1	12,5±1,3	31,8±1,7	74±2,9	93,6±4,1
	milieu aéré	125,1±2,8	158 ± 4,7	281 ±9,3	244,1±13,2	69,7±1,8	143,2±5,7	209±11,2	352±16,8

Les résultats du tableau 14 montrent de façon évidente l'effet positif de l'aération sur les voies respiratoires de la souche 1135 où l'activité de l'NADH oxydase est dans les premières 24 heures de culture multipliée par un facteur 6, contre un facteur de 1,3 pour la souche BrBv IV ; l'activité de l'NADH cytochrome c réductase, elle, est multipliée par un facteur de 2,8 contre un facteur de 1,4 pour la souche BrBv IV.

D'après ces résultats, il semble que la souche 1135 puisse en fonction de l'oxygène dissout favoriser certaines voies métaboliques.

En fioles à contre-pales où les échanges gazeux sont améliorés, la régénération du NADH cytoplasmique emprunte des voies différentes et plus énergétiques que dans les fioles sans contre-pale comme en témoigne d'une part, les accumulations plus faibles d'acide malique et d'autre part, l'augmentation de la biomasse enregistrées dans les fioles à contre-pales.

Ceci renforce donc l'hypothèse d'une étroite relation entre le potentiel rédox intramycélien et l'accumulation des acides organiques.

Connaissant les mécanismes impliqués dans l'accumulation des composés acides, il va désormais nous être possible d'agir sur ceux-ci pour limiter leurs productions, tout en gardant, voire en améliorant, la production d' α -amylase.

IV - CONCLUSION

Nous nous proposons d'établir pour conclure ce chapitre un schéma des mécanismes conduisant à l'accumulation des acides organiques chez les souches BrBv IV et 1135.

Avant d'établir ce schéma nous allons dégager les points essentiels des résultats exposés dans ce second chapitre.

Au niveau de la glycolyse ces résultats ont mis en évidence un comportement opposé chez les souches BrBv IV et 1135.

La souche 1135 aurait une glycolyse principalement orientée vers la voie HMP, alors que chez la souche BrBv IV, les activités des voies métaboliques HMP et EMP seraient équilibrées.

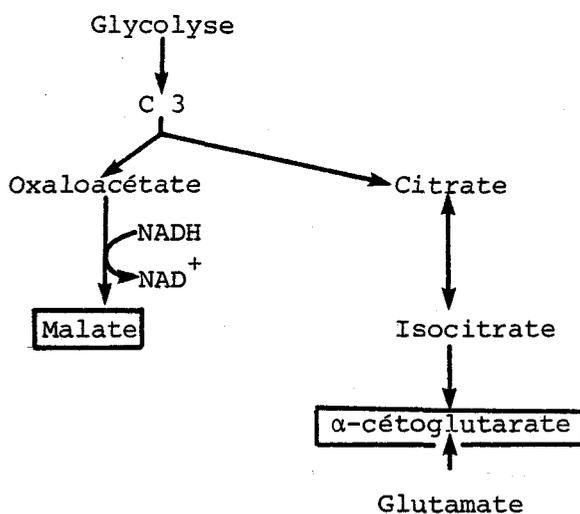
Pensant que l'acide malique était accumulé via le cycle glyoxylique, nous nous sommes orientés vers l'étude des activités isocitratase et isocitrate déshydrogénase. Nos travaux ont montré que, certes, ce cycle pouvait être fonctionnel du fait d'une régulation de l'isocitrate déshydrogénase par l' NADPH intramycélien, mais qu'en aucun cas il ne pouvait être le principal responsable de l'accumulation de l'acide malique, observation confirmée par l'étude successive de la malate syntéthase, de la succino-déshydrogénase et de la fumarase. Nous avons ensuite démontré que chez les souches BrBv IV et 1135 l'activité du cycle de Krebs était défaillante au niveau de l' α céto-glutarate déshydrogénase, et que cette défaillance, associée à un apport d'azote organique sous forme de glutamate, contribuait à l'accumulation de l'acide α -céto-glutarique.

Le dosage des coenzymes intramycéliens dans les premières 24 heures a révélé que les taux de NADH étaient plus élevés chez la souche 1135 que chez la souche BrBv IV, ce qui a été corroboré par les très faibles activités NADH oxydase et NADH cytochrome c oxydoréductase relevées après 24 heures de culture chez la souche 1135. L'acide malique étant accumulé pendant cette période, il paraissait évident que la souche 1135 utilisait la réduction de l'oxaloacétate en malate pour palier à l'insuffisance des processus aérobie, hypothèse qui a par ailleurs été confirmée par l'équilibre de cette réaction qui s'est avéré être fortement orienté vers la production d'acide malique. L'oxaloacétate, quant à lui, proviendrait d'une carboxylation d'un composé en C3 issu de la glycolyse. Nous n'avons pu identifier formellement l'enzyme responsable de cette activité mais, en fonction des références bibliographiques, nous avons tout lieu de suspecter la pyruvate carboxylase.

Plusieurs faits viennent appuyer l'hypothèse d'un tel schéma. Ainsi, la souche 1135 présente constamment des Q_R de très faible valeur, alors que son métabolisme fait appel principalement à la chaîne des hexoses monophosphates. D'autre part, l'accumulation de l'acide malique peut être sensiblement diminuée en aérant fortement les milieux de culture donc en facilitant le processus de régénération de NADH, ce qui a été confirmé par les activités NADH oxydase et NADH oxydoréductase en hausse dans ces conditions.

Cultivée sur maltose, la souche BrBv IV régénère le NADH exogène par le biais de ces deux enzymes alors que la présence de glucose dans le milieu de culture entraîne une répression des voies respiratoires qui conduit cette souche à utiliser des mécanismes de régénération du NADH similaires à la souche 1135, et ainsi à favoriser l'accumulation de l'acide malique dans les milieux de culture.

De sorte que nous pouvons proposer pour les deux souches un schéma commun des mécanismes conduisant à l'accumulation de l'acide malique et de l'acide α -cétoglutarique.



Connaissant les mécanismes d'accumulation de l'acide malique, nous avons, en aérant fortement les milieux de culture, réduit les rejets de cet acide sans toutefois augmenter corrélativement la production de l' α -amylase.

Il nous faut donc désormais rechercher le facteur responsable de la baisse de production de l' α -amylase pour espérer optimiser la production de cette enzyme.

Nous rechercherons ensuite le moyen de diminuer les rejets d'acides organiques tout en augmentant la production d' α -amylase.

Ceci ne pourra se faire qu'avec une étude fine des paramètres envisagés, or la culture en fiole agitée dans ce domaine s'est avérée très délicate. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers l'usage des protoplastes qui ont de plus l'avantage d'éliminer trois facteurs susceptibles d'interférer dans nos dosages : la paroi cellulaire, l'évolution du pH, la croissance.

C H A P I T R E III

ÉTUDE DES RAPPORTS LIANT L'ACCUMULATION DES
ACIDES ORGANIQUES ET LA SYNTHÈSE DE L' α AMYLASE
SUR LES PROTOPLASTES DES SOUCHES BRBV IV ET 1135.

Depuis que fut clairement établie leur capacité à régénérer leur paroi (PEBERDY et GIBSON, 1971), l'intérêt des protoplastes des champignons filamenteux dans les manipulations génétiques n'est plus à démontrer. Leur utilisation passe soit par la technique de fusion (FERENCZY et coll., 1974), soit par transformation avec de l'ADN exogène.

Par contre, leur utilisation à des fins biochimiques reste rare (ISAAC, 1978 ; ISAAC et GOKHALE, 1983). C'est pourquoi, après avoir dégagé un protocole d'isolement de protoplastes efficient pour les deux souches, nous vérifierons certaines de leurs propriétés physiologiques et biochimiques avant de nous intéresser aux relations liant la production d' α -amylase à l'accumulation d'acides organiques.

I - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Des protoplastes ont désormais été isolés à partir de la plupart des groupes taxonomiques des champignons (VILLANUEVA et GARCIA-ACHA, 1971 ; DE VRIES et WESSELS, 1973).

Bien que des méthodes d'isolement mécaniques (GEALT et coll., 1976) ou non enzymatiques (DURR et coll., 1975) existent, leur emploi reste limité en raison des risques élevés de lésion qu'elles présentent pour les protoplastes formés (FOURY et GOFFEAU, 1973). A l'heure actuelle, on tend à leur préférer des méthodes "douces" qui font appel à une digestion lytique des parois mycéliennes en milieu hypertonique. La maîtrise de cette technique passe cependant par l'étude de trois paramètres :

- le mycélium
- les enzymes lytiques
- la solution stabilisatrice.

1 - LE MYCÉLIUM

La libération de protoplastes dépend avant toute chose de l'hydrolyse enzymatique des parois hyphales et plus particulièrement des polysaccharides qui représentent 80 à 90% de leur poids sec, le glucose et la N-acétyl-D-glucosamine sont généralement les éléments de base de leur composition. Associés aux polysaccharides on trouve également des homo et hétéropolysaccharides, composés d'osamines, d'hexoses, d'acides uroniques, de méthylpentoses et de pentose (BARTNICKI-GARCIA, 1970). De plus, il faut ajouter à cette composition des parois la présence de lipides et de protéines (JOHNSTON, 1965 ; BULL, 1970).

En raison de la diversité dans la composition des polysaccharides, nous ne rappellerons ici que les grandes lignes de leur structure.

L'élément le plus répandu est un polymère de D-glucose connu sous le nom générique de glucanes (ROSENBERG, 1975) : cette appellation recouvre : le β (1-3)-glucane encore appelé R-glucane, le β (1-4)-glucane ou cellulose, l' α (1-3)-glucane ou S-glucane. Les parois renferment également une quantité variable de chitine (β (1-4) acétyl-glucosamine) et enfin toute une gamme de polymères comme des polyuronides, des polygalactosamines, de la mélanine... Cette diversité dans la composition des parois a conduit les auteurs à élaborer des protocoles spécifiques à chaque espèce.

Ainsi, pour DE VRIES et WESSELS (1973), la libération des protoplastes chez *Schizophyllum commune* passe par une présence nécessaire dans le complexe lytique de chitinase et de α 1-3 glucanase ; VAN DEN BROEK et coll. (1979) obtiennent des résultats identiques chez *Aspergillus nidulans*.

Etudiant le même organisme, ISAAC (1978) et PEBERDY (1980) estiment que le dépôt d' α 1-3 glucane n'intervient que sur des hyphes âgés et peut dans ce cas présenter un facteur important de résistance à la lyse. Pour ces auteurs, les enzymes essentielles à la lyse sont la chitinase et la β (1-3) glucanase.

Ces conclusions divergentes tirées à partir de l'étude d'un même organisme démontrent bien que la composition des parois mycéliennes varie non seulement en fonction de l'espèce étudiée, mais aussi en fonction du temps (TRINCI, 1978 ; FARKAS, 1979) et de la composition des milieux de culture (MUSILKOVA et FENCL, 1968 ; VAN DEN BROEK et coll., 1979). Pour ces auteurs, une concentration en glucose élevée accentue la formation d' α 1-3 glucane, alors qu'une concentration trop faible favorise la formation de mélanine, composé connu comme inhibiteur de la lyse mycélienne (BLOOMFIELD et ALEXANDER, 1968 ; BULL, 1970 ; ROSENBERGER, 1978).

Les auteurs s'accordent également à penser qu'un mycélium provenant de la phase exponentielle de croissance donne les meilleurs résultats (DE VRIES et WESSELS, 1972 ; PEBERDY et coll., 1976 ; ISAAC, 1978).

2 - LES ENZYMES LYTIQUES

Comme on le voit, pour obtenir un isolement optimum de protoplastes à partir d'un mycélium, le complexe enzymatique utilisé devra contenir un mélange d'enzymes adapté à la composition de la paroi.

Deux démarches sont possibles : soit utiliser une préparation enzymatique commerciale, soit préparer au laboratoire ce complexe enzymatique.

Parmi les solutions lytiques prêtes à l'emploi, la plus connue est sans conteste l'Hélicase (IBF), mélange enzymatique contenant de la B-glucuronidase et de la sulfatase. Employée avec succès dans l'isolement des protoplastes à partir des levures, son application s'étend à quelques champignons filamenteux, où elle est utilisée, soit seule (FERENCZY et coll., 1975, 1976), soit accompagnée d'additifs tels le 2 déoxy-D-glucose (FOURRY-GOFFEAU, 1973), le mercaptoéthanol (FERENCZY et coll., 1974) ou une autre enzyme telle la cellulase Onosuka R 10 (DEWAARD, 1976).

Comme autre préparation lytique commerciale, citons également la Cytohélicase (IFB), caractérisée par sa haute teneur en β -(1-3)-D-glucanase.

Bien que les préparations enzymatiques proposées dans le commerce aient l'avantage de posséder des propriétés constantes, leur emploi n'est pas toujours adapté au champignon étudié ; aussi a-t-on recours au laboratoire à la préparation d'enzymes lytiques d'origine microbienne.

Les enzymes lytiques étant inductibles, on peut, en fonction du substrat inclus au milieu de culture et de l'organisme cultivé, favoriser la synthèse d'une gamme assez large d'enzymes lytiques exocellulaires comme la chitinase, les B-glucanases, les α -glucanases...

Pour obtenir une préparation lytique appropriée aux parois du champignon étudié, PEBERDY et ISAAC (1976) préconisent d'inclure au milieu de culture des parois mycéliennes lyophilisées de ce champignon.

Parmi les espèces microbiennes le plus couramment employées pour la préparation de ces enzymes lytiques, citons : *Streptomyces venezuela* (PEBERDY et GIBSON, 1971 ; GIBSON et PEBERDY, 1972 ; PEBERDY et coll., 1976), *Trichoderma harzianum* (DE VRIES et WESSELS, 1972, 1973a, b ; PEBERDY et ISAAC, 1976 ; KEVEI et coll., 1977, 1979 ; MALARD, 1981).

3 - LA SOLUTION STABILISATRICE

L'absence de barrière protectrice osmotique externe, représentée par la paroi, provoque la lyse immédiate du protoplaste lors de sa libération. Pour éviter cet inconvénient majeur, un stabilisateur osmotique doit être associé au complexe lytique. Bien que l'emploi de sucre et de polyols aient donné des résultats positifs, on tend désormais à utiliser comme stabilisateur des sels inorganiques (LOPEZ et coll., 1966 ; PEBERDY et coll., 1976). Parmi ceux-ci, on rencontre fréquemment KCl, NaCl, NH_4Cl , Mg SO_4 ; le choix de la nature du stabilisant dépend non seulement de l'espèce mais aussi de la souche étudiée.

Ainsi, travaillant sur *A. nidulans*, PEBERDY et coll. (1976) indiquent NH_4Cl 0,4 M comme meilleur agent stabilisant ; ISAAC, sur une souche différente, obtient l'optimum de rendement avec KCl 0,6 M, alors que VAN DEN BROEK et coll. (1979), toujours sur *A. nidulans*, préconise $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Un lavage préalable du mycélium par une solution à concentration osmotique élevée apparaît aussi important pour le taux de libération et le rendement final en protoplastes. ISAAC (1978), MUSILKOVA et FENCL (1978) notent de même qu'un lavage par de l'eau distillée entraîne l'absence de libération de protoplastes.

II - ISOLEMENT DES PROTOPLASTES

De cette revue bibliographique, il ressort que la mise au point d'une méthode d'isolement de protoplastes optimale nécessite l'étude systématique de nombreux paramètres.

Pour cette étude, nous sommes partis d'un protocole de PEBERDY et ISAAC (1976) appliqué à *A. nidulans*. Le mycélium *A. oryzae* cultivé sur milieu de référence pendant 24 heures est recueilli par filtration, lavé par 300 ml de KCl 0,6 M et remis en suspension dans le complexe lytique fait d'un volume égal de filtrat concentré deux fois de *T. harzianum* et d'un tampon phosphate 0,2 M, pH6 contenant 1,2 M de KCl, à une concentration de 0,02 g de mycélium par ml de solution enzymatique. Après 3 h 30 d'incubation à 30°C sous agitation, les protoplastes sont séparés des débris mycéliens par filtration sur verre filtré porosité 1.

Afin d'éliminer le complexe lytique, deux centrifugations à 800 g, en présence de NaCl 0,7 M sont effectuées. Après reprise du culot de centrifugation dans la même solution, le rendement en protoplastes est mesuré par comptage à l'hématimètre.

Par cette méthode, MALARD (1981) obtenait environ 10^6 protoplastes par gramme de mycélium, résultats inférieurs à PEBERDY et ISAAC (1976) qui obtenaient chez *A. nidulans* 4×10^9 protoplastes. Nos premiers essais ont montré que la souche 1135 était la moins sensible à cette méthode d'isolement aussi l'avons-nous prise comme référence.

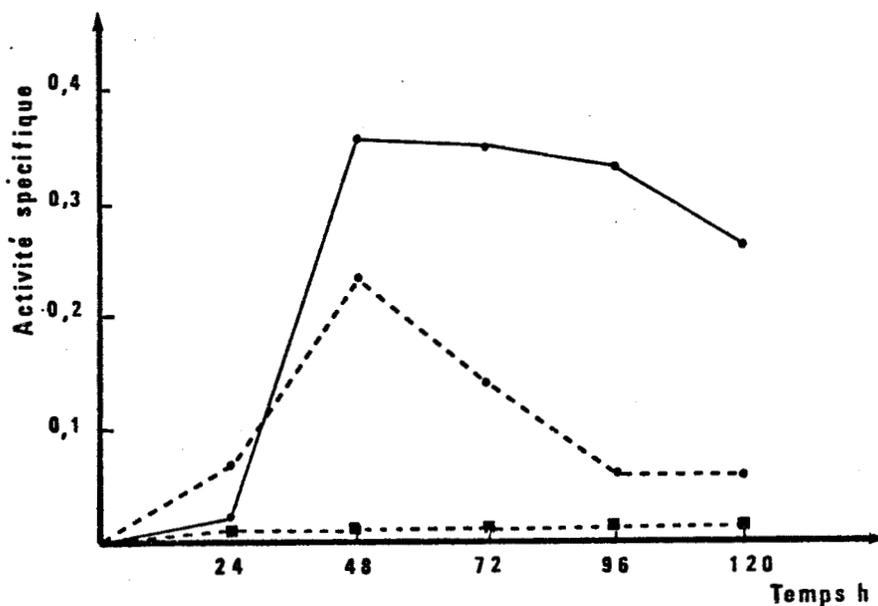
1 - PRÉPARATION DU COMPLEXE LYTIQUE

La production des enzymes essentielles à la préparation des protoplastes est induite par leurs substrats sous forme de chitine pour la chitinase, de laminarine ou de paroi hyphale pour la β 1-3 glucanase. Dans ce dernier cas nous avons préféré, vu le prix élevé de la laminarine, utiliser des parois hyphales.

Nous avons testé indépendamment les parois de BrBv IV et 1135 comme inducteur de la β 1-3 glucanase ; les résultats relevés dans la figure 11 ne montrent pas de différences significatives entre les deux souches, la β 1-3 glucanase étant probablement en excès dans les deux cas. Par contre, les parois seules ne peuvent induire en quantité suffisante la chitinase, aussi avons-

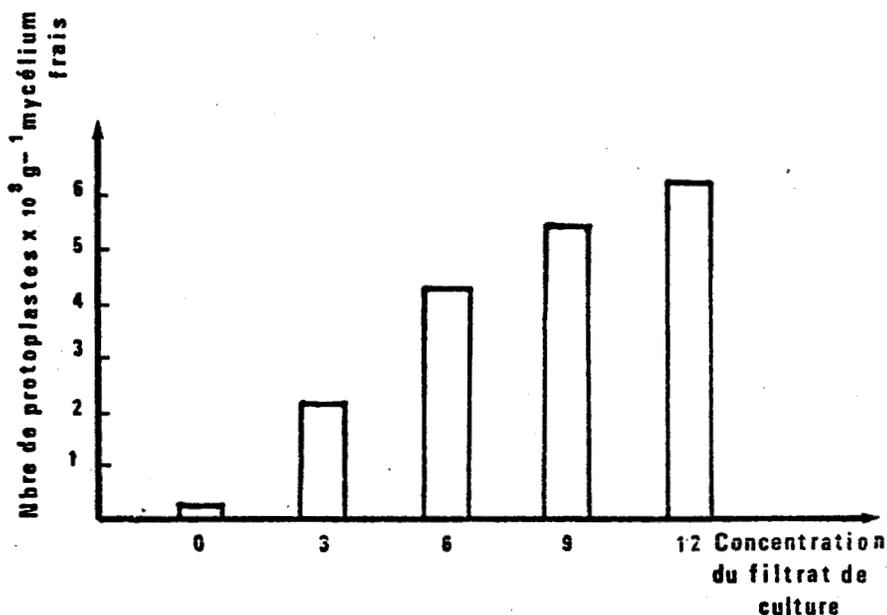
nous supplémenté le milieu par 5 g de chitine. Le dosage de ces deux activités enzymatiques révèle en outre que l'optimum de production se produit après 48 h dans nos conditions expérimentales. Les dosages effectués par ISAAC (1978) indiquaient un tel optimum commun aux chitinases et B 1-3 glucanase entre le 3ème et le 4ème jour.

Figure 11 : Evolution de l'activité spécifique de la B 1-3 glucanase, — de la chitinase (milieu supplémenté en chitine -•-•- milieu non supplémenté en chitine -■-■-) dans les filtrats de culture de *Trichoderma harzianum*



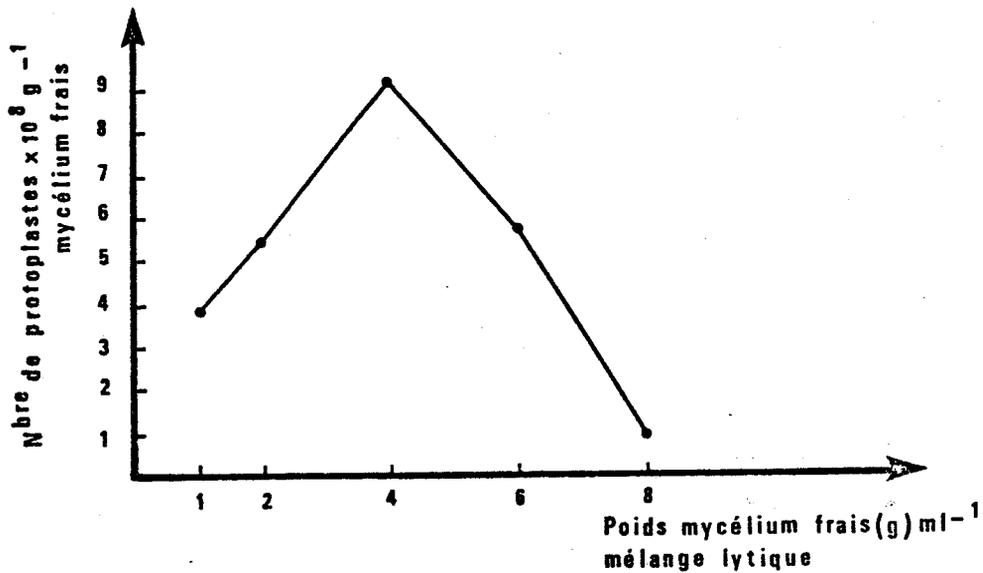
L'utilisation des filtrats de culture de *T. harzianum* sans préparation est impossible en raison de leurs faibles activités, c'est pourquoi une étape de concentration s'avère nécessaire. Nous avons testé cinq concentrations différentes, toutes effectuées à l'évaporateur rotatif à 28°C (figure 12).

Figure 12 : Influence de la concentration par évaporation sous vide du filtrat de culture de *Trichoderma harzianum* sur la formation des protoplastes



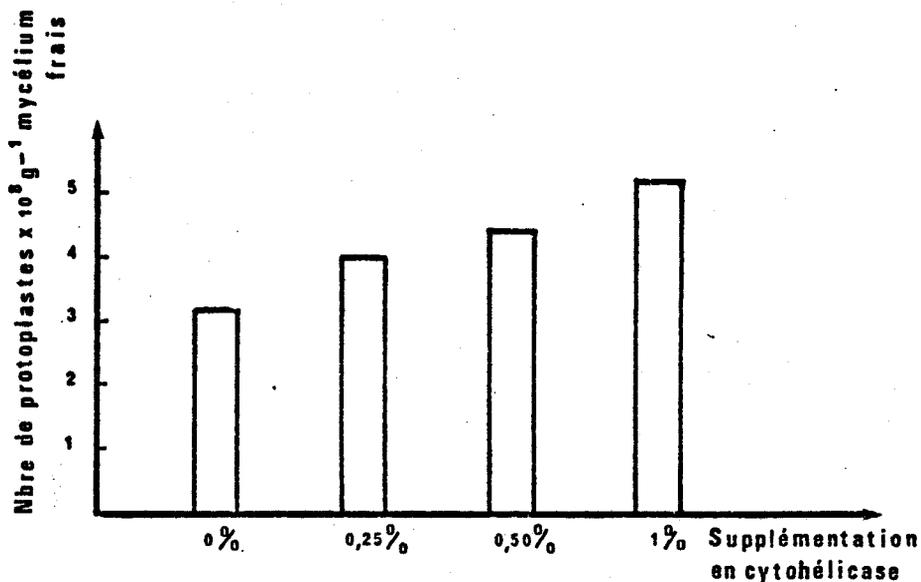
Les meilleurs rendements (nombre de protoplastes de mycélium frais) ont été enregistrés avec la concentration au 1/12, mais en raison des quantités importantes de complexe lytique utilisé pour nos expériences, une telle concentration aurait demandé trop de préparation, c'est pourquoi nous avons opté pour une concentration oscillant entre 1/6 et 1/8. A de telles concentrations 0,04 g de mycélium frais par millilitre de tampon lytique est la quantité nécessaire pour obtenir une action maximum des enzymes lytiques (figure 13).

Figure 13 : Influence du rapport du poids de mycélium frais par millilitre de mélange lytique sur la formation des protoplastes



On peut augmenter artificiellement l'activité du complexe lytique par supplémentation de celui-ci en cytohélicase. MALARD (1981), par l'adjonction de 1% (V/V) de cytohélicase, améliorait son rendement d'un facteur 30. Nous avons vérifié l'influence de cette supplémentation dans nos conditions expérimentales (figure 14).

Figure 14 : Influence de l'addition de concentrations croissantes en cytohélicase sur la formation des protoplastes



Avec des extraits lytiques concentrés de 6 à 8 fois, le gain apporté par 1% de cytohélicase n'est que de 30% ; nous avons pensé qu'une telle amélioration ne justifiait pas l'emploi d'un produit aussi coûteux.

2 - SOLUTION STABILISATRICE

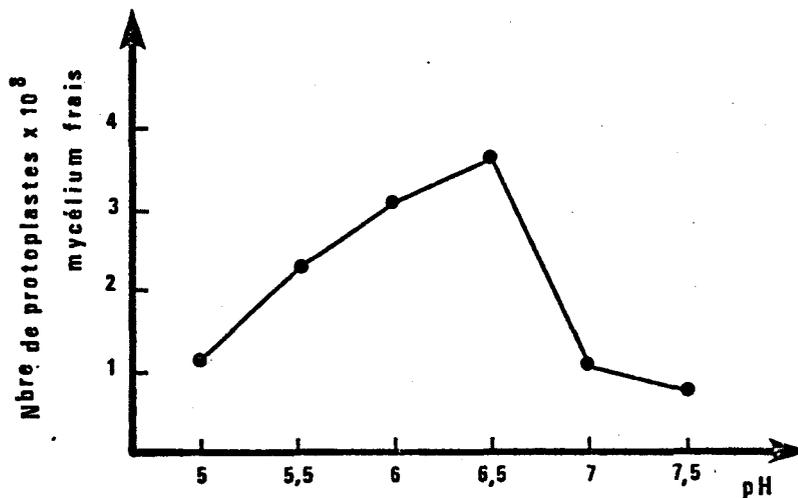
Le but de cette solution est double :

- amener le pH du complexe lytique à son optimum d'activité
- assurer une pression osmotique suffisante pour préserver les protoplastes une fois formés.

A/ pH de la solution

La plupart des digestions lytiques sont effectuées entre pH 5,5 et 6,8 (PEBERDY et coll., 1976) ; aussi avons-nous testé cette échelle de valeurs pour *A. oryzae*. Il apparaît que la production maximum de protoplastes liée au pH d'activité optimum des enzymes se situe dans une fourchette allant de 6 à 6,5 (figure 15).

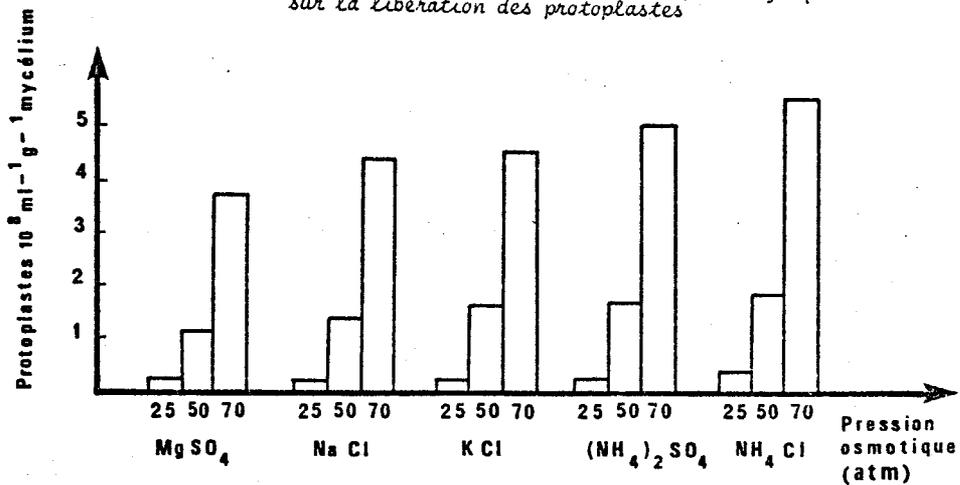
Figure 15 : Influence du pH sur la formation des protoplastes



B/ Pression osmotique

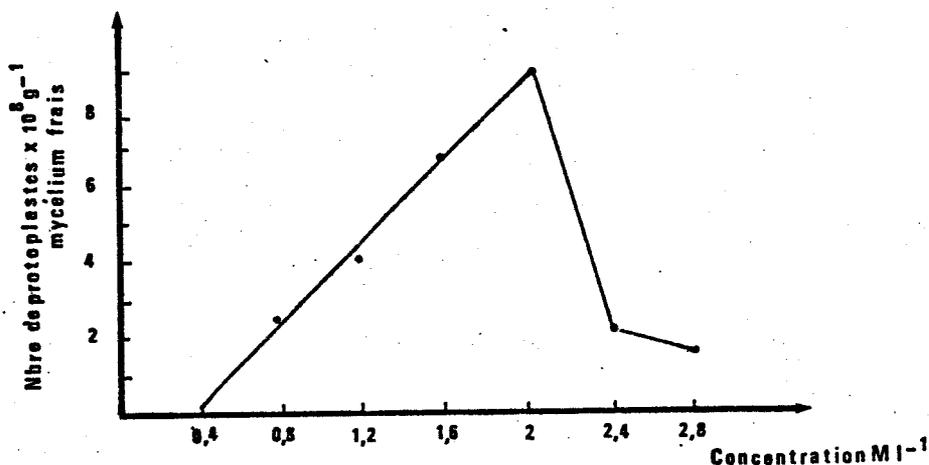
La pression osmotique du complexe lytique est assurée par un sel organique dissous dans un tampon phosphate 0,2 M pH 6. La concentration de ce sel n'est pas le seul facteur impliqué dans la formation des protoplastes ; en effet, de la nature de celui-ci dépendra pour une bonne part la libération des protoplastes du mycélium. Nous avons utilisé les composés réputés faciliter, dans la littérature, la fragmentation mycélienne : NaCl-Mg SO₄ (DEVRIES et WESSELS, 1972) ; NH₄ Cl-KCl (PEBERDY et coll., 1976) ; (NH₄)₂ SO₄ (VAN DEN BROEK, 1979). Voir figure 16.

Figure 16 : Influence de la nature de l'agent stabilisateur et de la pression osmotique du complexe lytique sur la libération des protoplastes



D'une manière générale, les concentrations les plus élevées apportent les meilleurs résultats ; cependant, à pression osmotique égale, les différences observées entre NH₄Cl et (NH₄)₂SO₄ démontrent que l'anion Cl⁻ donne de meilleurs résultats. Au niveau du cation, l'ion NH₄⁺ est le plus favorable à la libération des protoplastes, ainsi que le montre la comparaison entre NH₄Cl, KCl, NaCl. Cependant, nous préférons éliminer les ions NH₄⁺ pour l'éventuelle interférence qu'ils pourraient apporter en tant que source d'azote. Pour nos travaux sur la physiologie de la biosynthèse de l' α -amylase, nous avons retenu KCl pour ses résultats légèrement supérieurs à NaCl à pressions osmotiques égales, et MgSO₄ à titre de comparaison. Nous avons ensuite recherché l'optimum de concentration de ce sel pour obtenir un rendement maximum en protoplastes. Les résultats ont montré que pour KCl ce rendement est atteint en présence d'une concentration saline 2M. Cependant pour éviter l'altération des protoplastes par une pression osmotique trop élevée, nous avons préféré travailler avec un tampon phosphate 0,2M 1,6 M KCl soit, en présence du complexe lytique concentré au 1/6, à une pression osmotique de 61,3 atm.

Figure 17 : Influence de la concentration en KCl de la solution stabilisatrice sur la formation des protoplastes



3 - LE MYCÉLIUM

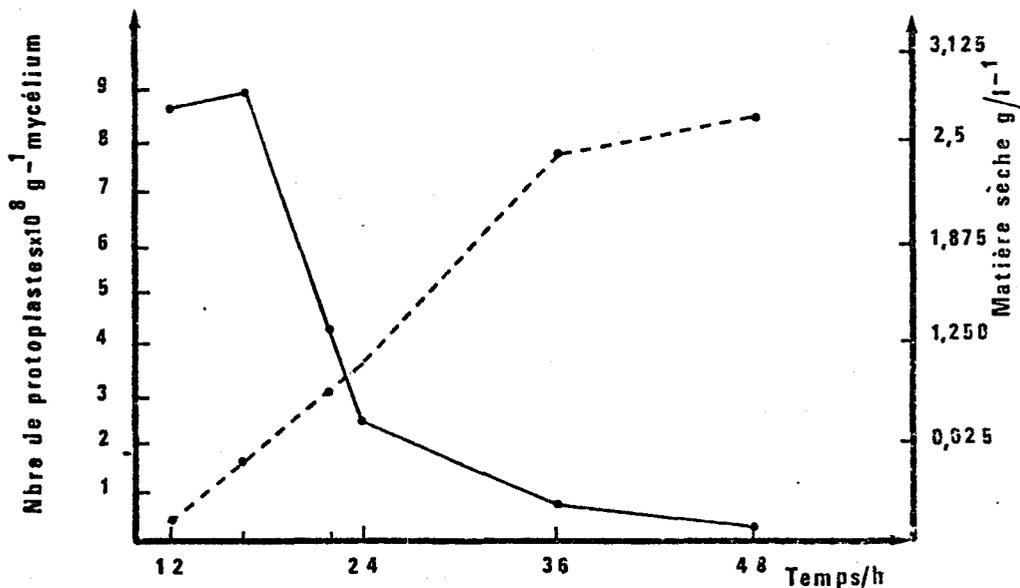
Toute modification dans la nature des parois mycéliennes entraîne des répercussions dans la formation des protoplastes. Aussi avons-nous étudié l'influence de l'âge des cultures, de la composition des milieux de culture et des prétraitements sur la nature des parois.

A/ Age du mycélium employé

Des mycéliums provenant de cultures d'âges différents ont été testés pour leur aptitude à produire des protoplastes (fig. 18). Dans ces expériences, le rendement optimal a été obtenu à partir de cultures de 15 à 20 heures, soit le milieu de la phase exponentielle de croissance. PEBERDY et coll. (1976) obtiennent ce résultat pour environ 20 heures de culture chez *A. nidulans*, ce qui correspond chez cette espèce à la fin de la phase exponentielle de croissance. Après cette période, il semble qu'un réarrangement structural protège les parois du mycélium de l'action des enzymes lytiques.

Pour la suite de nos expériences, nous avons récolté le mycélium devant être traité dans une fourchette de 17 à 20 heures de culture, période autorisant une récolte en mycélium suffisante.

Figure 18 : Influence de l'âge du mycélium sur le rendement en protoplastes libérés



B/ Composition du milieu de culture

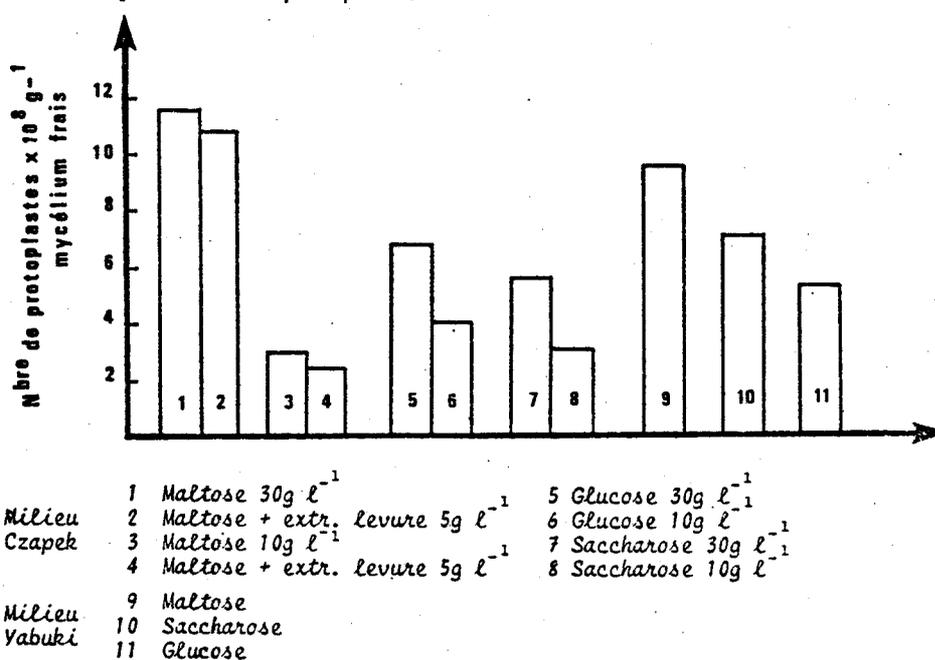
VAN DEN BROEK et coll. (1979) montrent que la substitution du glucose par d'autres sources de carbone n'influence pas la formation des protoplastes.

Nos travaux, au contraire, ont montré chez *A. oryzae* une relation étroite entre le rendement en protoplastes et la nature de la source de carbone (figure 19).

Les résultats montrent que des substrats utilisés, maltose, saccharose et glucose, c'est le maltose qui est le plus favorable à la lyse mycélienne. En raison des phénomènes de répression qu'ils entraînent, le glucose et le saccharose favorisent certainement chez *A. oryzae* la formation de composés secondaires impliqués dans la "maturation" de la paroi mycélienne, interprétation qui pourrait également expliquer les différents rendements obtenus entre les deux souches. En effet, nos travaux sur le métabolisme intermédiaire ont montré la réceptivité de la souche 1135 à ces phénomènes, d'où probablement son aptitude plus grande à former des composés secondaires.

Par rapport au milieu Yabuki, le milieu Czapek offre les meilleurs résultats sur maltose : par contre sur glucose et saccharose la teneur élevée en glucide de ce milieu (30 g l^{-1}) peut sans doute freiner la mélanisation de la paroi (BULL, 1970) mais peut favoriser la formation accélérée de $\beta(1-3)$ glucane (ZONNEVELD, 1974). Les résultats inférieurs sur milieu Yabuki au maltose pourraient trouver leur explication soit dans la teneur en sucre de ce milieu (10 g l^{-1}), soit dans la présence de composés complexes comme la néopeptone.

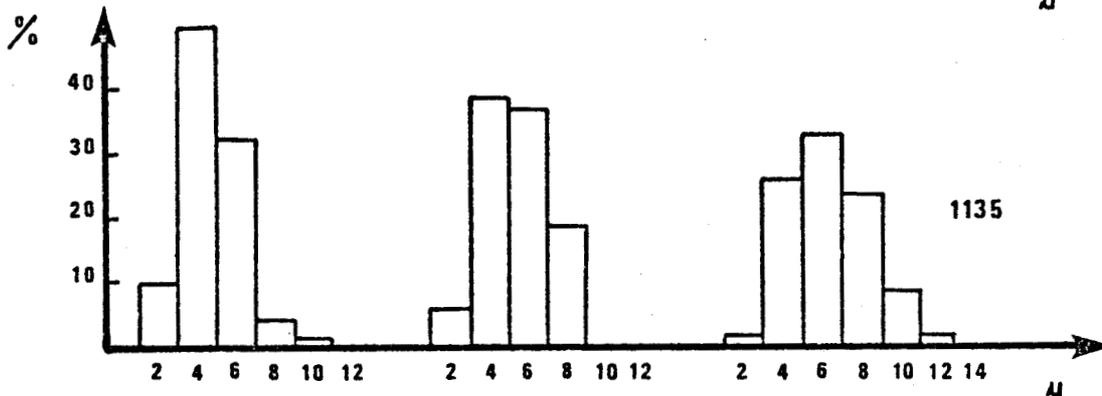
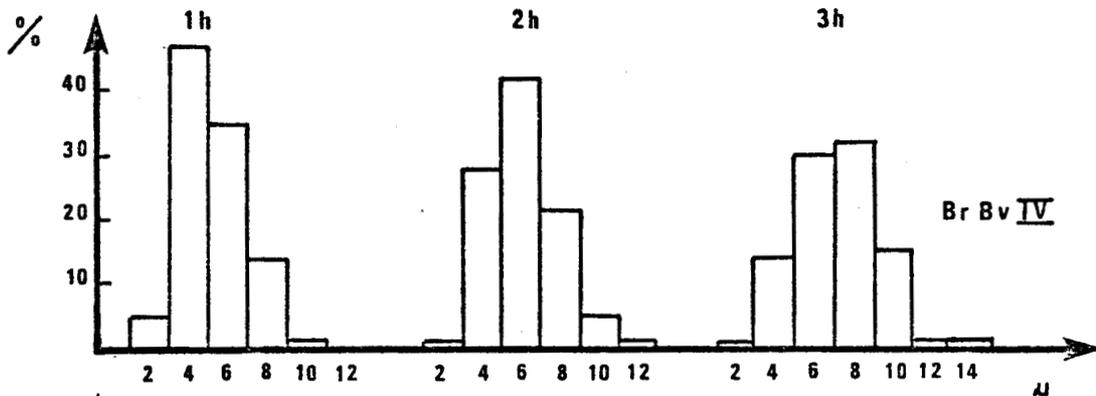
Figure 19 : Influence de la composition du milieu de culture sur la formation des protoplastes



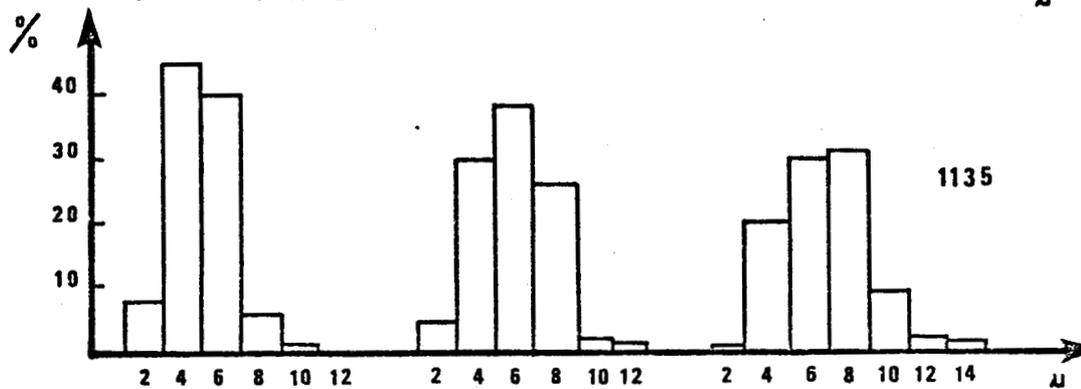
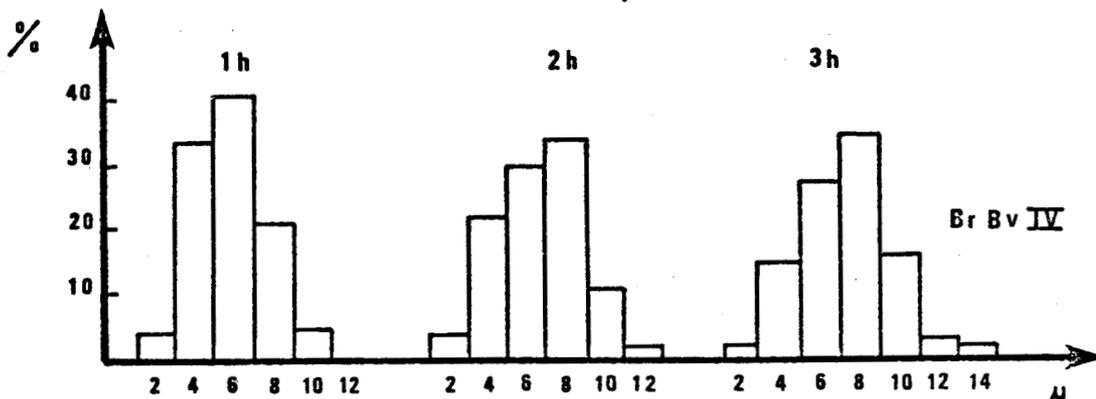
L'expérience sur Czapek additionnée de néopeptones montre que ce composé influence défavorablement la libération de protoplastes ; l'extrait de levure quant à lui, a peu d'influence. Par contre, l'apport de 30 g l^{-1} de maltose paraît indispensable pour un rendement optimum.

Planche 29: Evolution de la taille des protoplastes des souches BrBv IV et 1135 en fonction de deux agents stabilisants

KCl



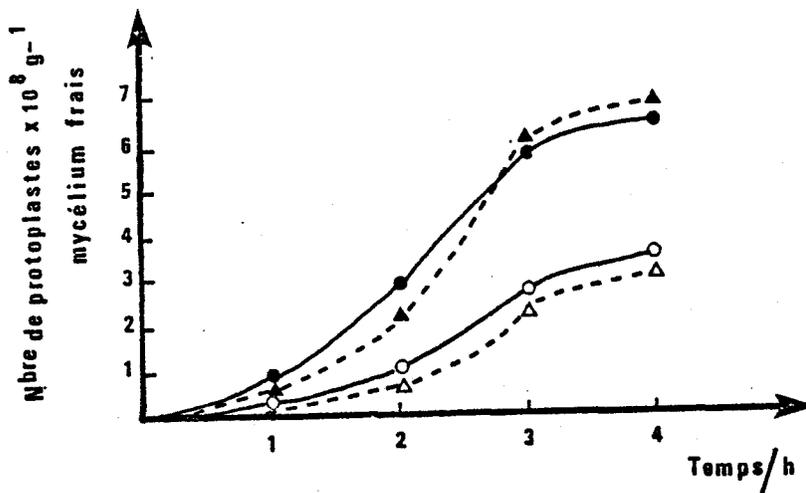
Mg SO₄



4 - MORPHOLOGIE DES PROTOPLASTES FORMÉS

La libération des protoplastes commence après 20 à 25 minutes d'incubation dans le complexe lytique (figure 20). Après 4 heures d'incubation on peut considérer que chez les deux souches la plus grande partie du mycélium a été lysée. La souche BrBv IV produit de trois à quatre fois plus de protoplastes que la 1135 ; sans doute faut-il y voir une conséquence de leur différenciation physiologique.

Figure 20 : Cinétique de production des protoplastes des souches BrBv IV (symboles noirs) et 1135 (symboles blancs) en présence de KCl et $Mg SO_4$ comme stabilisant



D'une manière générale, les protoplastes libérés par la souche BrBv IV ont une taille sensiblement plus élevée que celle des protoplastes de la souche 1135. Des deux agents stabilisants, $MgSO_4$ est celui qui donne les valeurs les plus élevées chez 1135 alors que KCl donne un optimum de protoplastes chez BrBv IV. On remarque également une évolution morphologique des protoplastes formés ; après une heure d'incubation on assiste à une libération des protoplastes de petite taille non vacuolés, alors qu'après trois heures d'incubation les protoplastes sont de taille accrue avec pour la plupart une grande vacuole. D'après ISAAC, les premiers protoplastes relargués dans la première heure proviennent de l'extrémité hyphale et sont à 50% dépourvus de noyau ; après cette période le mycélium est lysé séquentiellement vers les parties les plus âgées de l'hyphes.

Nous avons cherché à savoir si cette hétérogénéité dans la morphologie des protoplastes correspondait à une hétérogénéité physiologique.

Pour cela, nous avons mesuré la respiration de ces divers protoplastes, étudié l'activité de certaines enzymes du métabolisme intermédiaire, contrôlé la régénération des parois.

5 - CONTROLE PHYSIOLOGIQUE DES PROTOPLASTES ISOLES

A/ Mesure des coefficients respiratoires

Nous avons employé une technique identique à celle employée pour le mycélium, à part que le milieu était rendu hypertonique par KCl 0,8 M.

Tableau 15 : *Respiration des protoplastes des souches BrBv IV et 1135 relevée sur glucose et maltose.*

Souche	Substrat	Temps d'incubation lytique	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l CO}_2$	Q R
BrBv IV	Maltose	1 h	13,44	13,32	0,99
		2 h	12,32	11,84	0,96
		3 h	10,93	10,38	0,95
	Glucose	1 h	6,97	4,66	0,67
		2 h	5,83	4,02	0,69
		3 h	5,03	3,22	0,63
1135	Maltose	1 h	9,81	6,20	0,63
		2 h	8,93	5,09	0,57
		3 h	7,69	4,53	0,59
	Glucose	1 h	6,31	2,96	0,47
		2 h	6,09	1,23	0,45
		3 h	5,23	2,67	0,50

Comme le montrent les résultats du tableau, on retrouve sur les protoplastes les caractères physiologiques déjà observés sur le mycélium, à savoir qu'en présence d'un substrat comme le maltose on observe un QR qui, pour la souche BrBv IV, est de 0,99 alors que pour la souche 1135 il est de 0,59. En présence de glucose, le QR pour la souche 1135 est de 0,51, alors que pour la souche BrBv IV il tombe à 0,67.

Il est à noter que les protoplastes récoltés après 3 heures d'incubation ont une respiration plus faible que les protoplastes récoltés après 1 heure d'incubation. Il est cependant difficile de préciser si ce phénomène est dû à une différence morphologique ou à une altération des protoplastes due à l'incubation lytique.

B/ Etude de la glucose-6-P déshydrogénase, de la malate déshydrogénase et de la NADH cytochrome c oxydoréductase

Nous avons choisi ces enzymes pour leur appartenance aux trois voies métaboliques distinctes étudiées dans le chapitre précédent : la glycolyse, le cycle de Krebs, la chaîne respiratoire.

La technique de mesure de leurs activités est renseignée dans l'annexe 4.

Tableau 16 : Evolution des activités spécifiques glucose-6-P déshydrogénase, malate déshydrogénase et NADH cytochrome c oxydoréductase, relé-
vée en fonction du temps de digestion lytique, sur des proto-
plastés éclatés des souches BrBv IV et 1135.

Activité enzymatique	Temps de digestion lytique (heures)							
	1	2	3	4	1	2	3	4
Souche	BrBv IV				1135			
Glucose-6-P déshydrogénase	16,1	15,9	15,6	15,2	28,2	27,7	26,9	26,6
Malate déshydrogénase	351,7	348,2	340,3	335,5	424,1	401,6	407,4	394,1
NADH cytochrome c oxydoréductase	47,2	41,3	42,9	40	5,4	5,1	4,6	3

Comme en témoignent les résultats, l'hétérogénéité structurale des protoplastes ne semble pas affecter leur physiologie puisque nous avons constamment retrouvé les trois activités enzymatiques, et ce dans des rapports assez proches.

Une autre constante observée est la perte d'activité entre la première et la quatrième heure de digestion lytique. ISAAC (1983), observant des résultats similaires sur la cytochrome oxydase, conclut que les propriétés physiologiques et biochimiques du cytoplasme dépendent de sa localisation.

C/ Régénération des protoplastes

Les protoplastes ont la propriété de recouvrir leur paroi après un certain laps de temps et, de cette façon, de retourner à une forme végétative normale. MALARD, en observant l'affinité d'un fluorochrome, le calcofluor-white, vis à vis de la chitine, a montré qu'après 8 heures d'incubation dans le milieu Deprez dilué de moitié et rendu hypertonique par du Na Cl 0,6 M, 50 % des protoplastes émettaient un début de fluorescence et donc avaient recouvert en partie leur paroi, la régénération étant complète après 24 heures d'incubation.

Le contrôle de cette étape est important pour notre laboratoire car nous envisageons dans un proche avenir de modifier le génome de certaines espèces par fusion de protoplastes. La régénération des protoplastes fusionnés étant une condition *siné qua none* à ces manipulations, nous avons étudié les paramètres influençant leurs réversions.

- Temps d'incubation lytique

ISAAC ayant montré que chez *A. nidulans* près de 50% des protoplastes relargués dans la première heure ne possédaient pas de noyau, nous avons étudié l'influence d'une telle possibilité sur la réversion des protoplastes chez les souches BrBv IV et 1135 après successivement une et quatre heures de digestion lytique, avec comme stabilisant $Mg SO_4$ et KCl 0,6 M. Le milieu de régénération est un milieu Czapek gélosé contenant 0,8 M KCl ; la solution de dilution est composée de KCl 0,8 M et $Mg SO_4$ 0,8 M.

Tableau 17 : Pourcentages de réversion des protoplastes des souches 1135 et BrBv IV par rapport au nombre de protoplastes dénombrés à l'hématimètre, en fonction du temps de digestion lytique et de la nature de l'agent stabilisant.

	Souche	BrBv IV		1135	
	Solution saline	$MgSO_4, 7H_2O$ 0,8 M	KCl 0,8 M	$MgSO_4, 7H_2O$ 0,8 M	KCl 0,8 M
Réversion après 1 heure de lyse	Dilution				
	10^{-1}	+	+	+	+
	10^{-3}	6,6	9,1	18,3	10
Réversion après 3 heures de lyse	10^{-1}	7,5	12,5	21,7	15,2
	10^{-2}	+	+	+	+
	10^{-3}	12,6	13,2	17,6	11,4
		15	19,4	27,8	17,8

+ = plus de 200 colonies par boîte de Pétri.

Les écarts assez importants observés entre chaque dilution d'un même échantillon pourraient trouver leur origine dans la tendance très nette qu'ont les protoplastes à s'aggréger en milieu liquide. Des deux sels étudiés, $MgSO_4$ donne les meilleurs résultats pour la souche 1135, et KCl pour la souche BrBv IV. Mais quel que soit l'agent stabilisant, les pourcentages de réversion sont plus élevés après 3 heures de lyse, confirmant ainsi les observations d'ISAAC sur la composition nucléaire des ces protoplastes.

- Concentration de l'agent stabilisant

Nous avons échelonné les concentrations de KCl entre 0,6 et 1,2 M afin de déterminer l'optimum de réversion.

Tableau 18 : Pourcentages de réversion des protoplastes des souches BrBv IV et 1135 par rapport au nombre de protoplastes dénombrés à l'hématimètre, en fonction de la concentration en KCl de la solution de dilution et du milieu de régénération.

Concentration	Dilution	Souche	
		BrBv IV	1135
0,6 M	10^{-2}	+	+
	10^{-3}	4,2	12
	10^{-4}	9,6	15
0,9 M	10^{-2}	+	+
	10^{-3}	17,1	18,4
	10^{-4}	21,7	14,2
1,2 M	10^{-2}	+	+
	10^{-3}	19	17,1
	10^{-4}	33,7	28,2

+ = plus de 200 colonies par boîte de Pétri.

Avec 28,2% de réversion pour la souche BrBv IV et 33% pour la souche 1135, le tableau 18 montre que les concentrations les plus élevées favorisent la réversion des protoplastes. Ces pourcentages, s'ils restent relativement faibles, permettront néanmoins au laboratoire d'envisager la fusion des protoplastes.

Ces expériences de réversion ont été effectuées directement après la lyse du mycélium mais il est parfois nécessaire, faute de temps, de stocker les protoplastes durant une nuit à 4°C. Nous avons étudié l'influence de ce stockage sur la réversion protoplasmique.

Tableau 19 : Pourcentages de réversion des protoplastes des souches BrBv IV et 1135 par rapport au nombre de protoplastes dénombrés à l'hématimètre, en fonction de la concentration en KCl de la solution de dilution et du milieu de régénération. Résultats enregistrés après stockage des protoplastes 16 h à 4°C dans la solution de dilution.

Concentration	Dilution	Souche	
		BrBv IV	1135
0,6 M	10^{-2}	0,6	1,2
	10^{-3}	1,5	2,3
	10^{-4}	-	-
0,9 M	10^{-2}	2,1	0,9
	10^{-3}	1,3	3,4
	10^{-4}	-	-
1,2 M	10^{-2}	4,5	3,6
	10^{-3}	8,9	7,7
	10^{-4}	-	-

Comparés aux pourcentages de réversion du tableau 18, les résultats du tableau 19 montrent qu'une perte de viabilité importante intervient après conservation des protoplastes à 4°C, les concentrations les plus élevées restant les plus favorables à la conservation des protoplastes.

III - ETUDE DE LA PHYSIOLOGIE DE PRODUCTION DE L' α -AMYLASE ET DE L'ACIDE MALIQUE SUR LES PROTOPLASTES DES SOUCHES BRBV IV ET 1135

Dans cette étude, nous avons adopté le milieu minéral suivant :

Na NO ₃	100 µg/ml
Mg SO ₄	20 µg/ml
Ca Cl ₂	0,1 µg/ml
Mn SO ₄	0,1 µg/ml
Substrat	1 mg/ml

L'hypertoncité du milieu a été assurée par KCl 0,8 M. Toutes les expériences ont été effectuées avec $2 \cdot 10^6$ protoplastes/ml.

I - ÉTUDE DE LA PRODUCTION D' α -AMYLASE

Pour s'assurer que la synthèse d' α -amylase était une synthèse de novo et non une libération progressive d'enzyme, qu'auraient pu contenir initialement les protoplastes, nous avons suivi la production d' α -amylase de protoplastes des deux souches incubées dans les milieux suivants :

- solution de Na Cl 0,6 M
- H₂O stérile
- milieu minéral maltosé.

Tableau 20 : Evolution de la synthèse de l' α -amylase chez des protoplastes des souches BrBv IV et 1135 incubés sur différents milieux.

Temps d'incubation (h)	BrBv IV			1135		
	Na Cl 0,6 M	H ₂ O stérile	milieu maltose	Na Cl 0,6 / 1	H ₂ O stérile	milieu maltose
0	-	0,9	-	-	-	-
1	-	0,9	1,88	-	-	0,85
2	-	0,8	3,56	-	-	1,81
3	-	0,9	7,09	-	-	2,6
4	-	0,7	14,5	-	-	3,49
5	-	0,8	20,8	-	-	3,97
6	-	0,7	32,9	-	-	4,32

Concentrations exprimées en PS 50 ml⁻¹

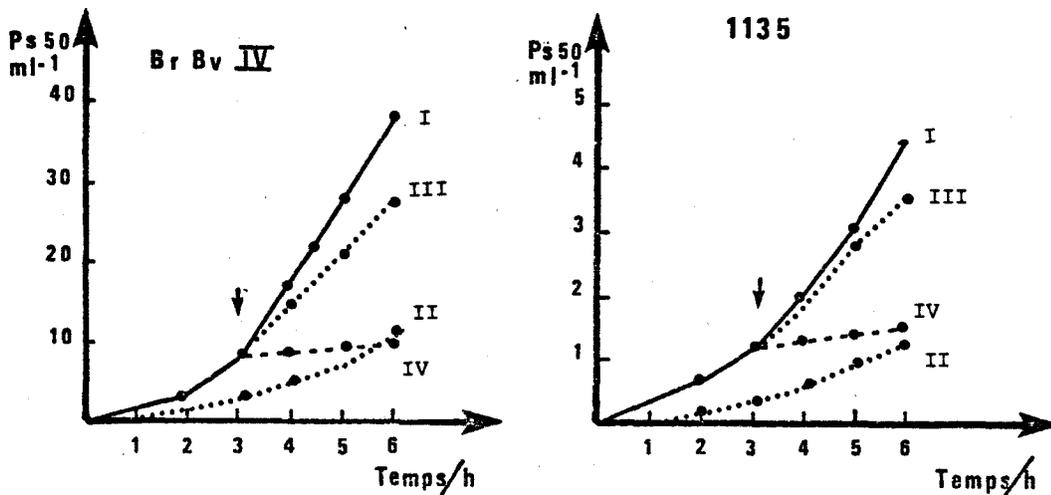
Les résultats obtenus, tableau 20, démontrent que la synthèse d' α -amylase résulte d'une synthèse de novo. En effet, aucune activité ne peut être décelée en milieu contenant uniquement Na Cl 0,6 M ; de plus, après éclatement des protoplastes dans l'eau distillée, nous n'avons pu mesurer qu'une faible activité sans aucune proportion avec celle observée en milieu maltosé.

L'observation des résultats du tableau 20 appelle plusieurs observations :

1°) La similitude entre ces résultats et les courbes obtenues en culture agitée montre que la production d' α -amylase et le rapport de cette production chez les deux souches ne sont pas modifiés par l'absence de paroi cellulaire. Il serait peut-être intéressant, en prenant comme base les travaux des écoles russe et japonaise sur le rôle de la paroi dans la régulation d' α -amylase, de définir chez 1135 et BrBv IV le rôle précis d'un tel mécanisme sur cette synthèse. Quoiqu'il en soit, il semble que la différence d'activité entre les deux souches résulte d'un processus interne propre à chacune d'elle, processus qui serait sans rapport avec la paroi cellulaire.

2°) La synthèse d' α -amylase, principalement chez la souche BrBv IV, se fait de manière exponentielle, ce qui dans nos conditions expérimentales pourrait signifier la synthèse de nouveaux ARN ménagés par la cellule. Dans le cas où cette hypothèse serait vérifiée, on peut se demander dans quelle mesure la différence d'activité que nous observons entre les deux souches ne reflète pas leur efficacité plus ou moins grande à transcrire ou à traduire de nouveau m ARN. Pour vérifier la valeur d'une telle hypothèse, nous avons étudié l'action d'un inhibiteur de la transcription (l'actinomycine D) et de la traduction (cycloheximide) sur la biosynthèse d' α -amylase.

Figure 21 : Effet de l'actinomycine D (100 μ g/ml) et de la cycloheximide (2 μ h/ml) sur l'induction de l' α -amylase sur des protoplastes des souches BrBv IV et 1135. I - Témoin ; II - Actinomycine ajoutée à 0 h ; III - Actinomycine ajoutée après 3 h d'incubation ; IV - Cycloheximide ajoutée après 3 h d'incubation

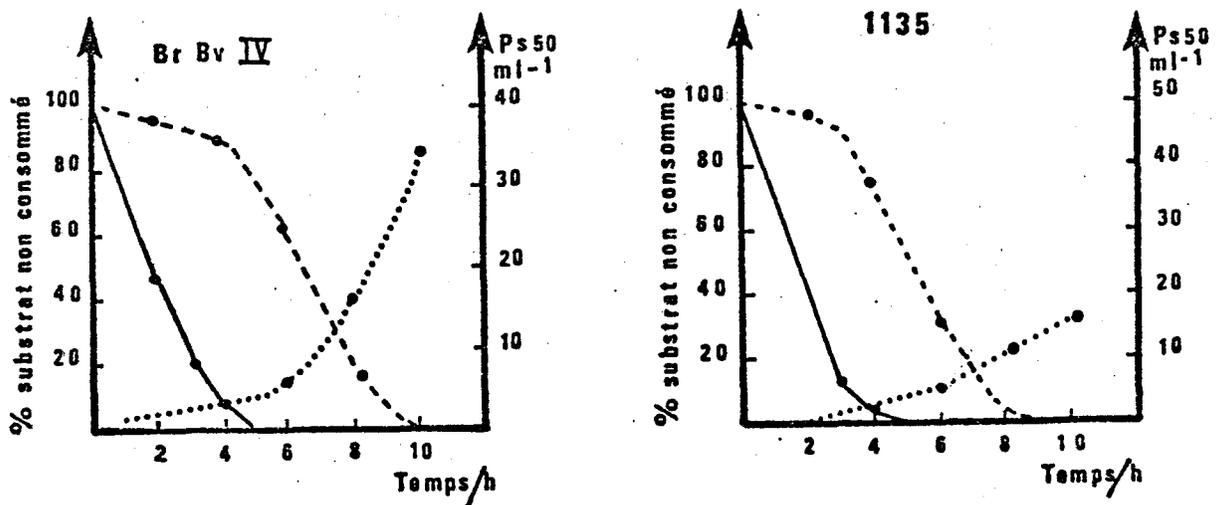


L'induction de l' α -amylase par le maltose peut être inhibée par l'actinomycine D (figure 21), cependant cette inhibition dépend de la période à laquelle l'inhibiteur est ajouté. L'action de l'actinomycine D est considérablement réduite si celle-ci est ajoutée après 3 heures d'incubation. VAN WIJK et coll. (1969), étudiant l'induction de l' α -glucosidase, suggèrent sur la base de résultats similaires que la synthèse de mRNA codant pour la protéine s'effectue dans les premières heures d'incubation, la production de cette protéine étant ensuite principalement due à la lecture des mRNA ; hypothèse renforcée par l'inhibition de cette synthèse après 3 heures d'incubation par la cycloheximide.

La synthèse de l' α -amylase est donc un système inductible et, de ce fait, susceptible d'être soumise à la répression catabolique. Bien que les résultats enregistrés dans le chapitre I le laissent clairement entrevoir, nous avons incubé les protoplastes des deux souches en présence de glucose et de maltose pour déterminer l'exactitude de cette hypothèse.

2 - ÉTUDE DE LA RÉPRESSION CATABOLIQUE EXERCÉE PAR LE GLUCOSE SUR LA SYNTHÈSE DE L' α -AMYLASE

Figure 22 : Induction de l' α amylase sur des protoplastes des souches BrBv IV et 1135 incubées sur un milieu composé de 3% de glucose — et 4% de maltose — — —.



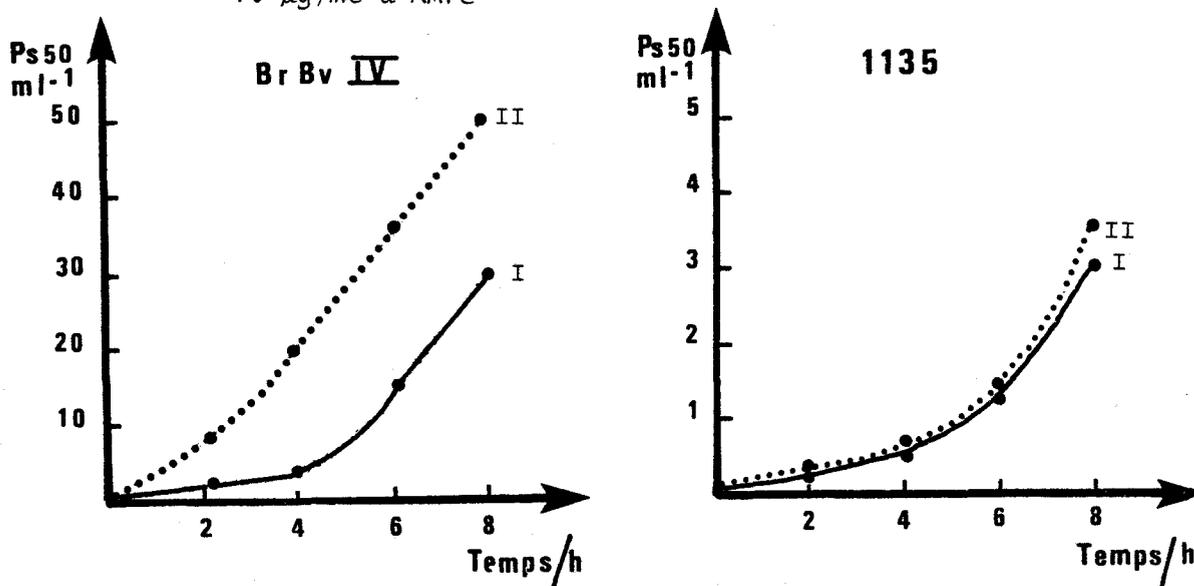
Les résultats de la figure 22 montrent que chez BrBv IV l'assimilation du maltose reste faible en présence de glucose. Il semble en effet, selon VAN RIJN et VAN WIJK (1972), que le glucose réprime la synthèse de la perméase spécifique au maltose. La production d' α -amylase en présence de glucose reste également très faible ; il faut attendre la disparition quasi-totale du glucose pour voir cette synthèse augmenter de façon brutale. Bien que la consommation du glucose et du maltose par la souche 1135 suive un schéma similaire à la souche BrBv IV, l'épuisement du glucose ne provoque qu'une légère amélioration de la synthèse d' α -amylase. Cette amélioration serait due à

une dérèpression masquée par une synthèse naturellement faible sur maltose, mais qui pourrait être également birésultante d'autres facteurs comme par exemple l'induction par le maltose de voie métabolique plus favorable à cette synthèse.

La répression catabolique paraît donc jouer un rôle déterminant chez la souche BrBv IV d'une part dans la synthèse de l' α -amylase et d'autre part, ainsi que nous l'avons vu dans le chapitre II, dans l'accumulation des acides organiques. On connaît désormais l'importance jouée par l'AMPc dans la répression catabolique. Selon PETER-LPSFLU (1977), le glucose pénétrant dans la cellule inhibe l'action de l'adénylatocyclase, ce qui va provoquer une chute de l'AMPc intracellulaire. Or, l'AMPc agit notamment au niveau de l'initiation de la transcription en se fixant sur une protéine réceptrice, la CAP (Catabolite gene Activator Protein). Le complexe CAP-AMPc se fixe à proximité du promoteur du gène soumis à la répression catabolique favorisant la formation du complexe promoteur-ARN polyménase et donc la transcription du gène. L'AMPc augmente donc l'affinité de la CAP pour l'ADN.

Avec les travaux de WISEMAN et LIM (1975), MAHLER et LIN (1978), PASTAN et ALDYA (1976), on sait aujourd'hui qu'il est possible de lever la répression catabolique par apport d'AMPc au milieu extérieur. C'est cette expérience que nous avons tentée chez *A. oryzae*.

Figure 23 : Influence de l'AMPc sur la synthèse d' α -amylase chez des protoplastes incubés dans un milieu contenant 5 % de glucose et 2 % de maltose. I - Milieu sans AMPc ; II - contenant 10 μ g/ml d'AMPc



Chez la souche BrBv IV, les résultats de la figure 23 montrent que l'AMPc est capable d'influer positivement sur la synthèse de l' α -amylase en présence d'un milieu contenant 5% de glucose et 2% de maltose. La plupart des auteurs attribuent cet effet à la fixation de l'AMPc sur la protéine CAP, bien que PALL (1981) émette quelques réserves. L'AMPc pourrait en effet, chez certaines levures, inhiber l'assimilation du glucose (SOMASUNDARAM et coll., 1980).

Cependant, si l'AMPc agit bien sur la fixation de la protéine CAP, il est à remarquer qu'une différence très nette s'établit entre la souche BrBv IV et la souche 1135. Alors que chez la souche BrBv IV l'action positive de l'AMPc est très sensible, chez la souche 1135 cette action n'est significative qu'après 8h d'incubation. Nous avons également recherché si l'apport d'AMPc pouvait réduire la production d'acide malique, celui-ci étant produit chez la souche BrBv IV, selon notre hypothèse du chapitre II, en réponse à la répression catabolique qu'exerce le glucose sur la respiration.

Tableau 20 : Influence de l'AMPc sur l'accumulation de l'acide malique chez des protoplastes des souches BrBv IV et 1135 incubés dans un milieu contenant 5% de glucose et 2% de maltose

Souche	BrBv IV		1135	
	Milieu sans AMPc	Milieu supplémenté avec 10 µg/ml d'AMPc	Milieu sans AMPc	Milieu supplémenté avec 10 µg/ml d'AMPc
0	-	-	-	-
2	48 ± 2,1	25 ± 1,8	53 ± 1,9	49 ± 3,1
4	152 ± 5,3	37 ± 2,4	197 ± 8,1	186 ± 7,6
6	178 ± 6,1	54 ± 3,2	236 ± 10,1	225 ± 9,4
8	191 ± 6,7	63 ± 2,6	261 ± 13,4	238 ± 11,2

Concentrations d'acide malique exprimées en µg ml⁻¹.

Le test t n'a pas permis de déceler de différences significatives entre les valeurs relevées chez la souche 1135 traitée et non traitée avec l'AMPc ceci à un taux de probabilité de 1%.

D'après les résultats du tableau 20, l'AMPc affecte également la production d'acide malique de façon significative pour la souche BrBv IV, alors que pour la souche 1135 nous n'avons pas obtenu une telle différence entre les milieux sans et avec AMPc. Ceci tend à confirmer l'hypothèse émise dans le chapitre II selon laquelle l'accumulation de l'acide malique chez la souche BrBv IV serait principalement due à la répression catabolique ; chez la souche 1135 par contre, cette accumulation serait plutôt le fait d'une déficience d'une ou plusieurs enzymes du système respiratoire.

Certains auteurs notent cependant qu'une inhibition partielle de la chaîne respiratoire peut améliorer la production d' α -amylase. A ce sujet, MALKOV et DEEVA (1961) préconisent l'emploi de NaF en faible concentration. L'utilisation d'un tel composé nous a paru intéressante car WISEMAN et LIM (1977) ont montré que la répression exercée par le glucose sur la synthèse de l' α -glucosidase pouvait être levée par le fluorure de sodium.

3 - ACTION DU FLUORURE DE SODIUM SUR LA PRODUCTION DE L' α -AMYLASE

Tableau 21 : Influence du fluorure de sodium sur la synthèse de l' α -amylase chez des protoplastes des souches BrBv IV et 1135 incubés sur glucose

Souche	BrBv IV			1135		
Temps d'incubation (h)	Concentration de Na F dans les milieux de $\mu\text{g ml}^{-1}$			Concentration de Na F dans les milieux $\mu\text{g ml}^{-1}$		
	0	100	300	0	100	300
0	-	-	-	-	-	-
2	1,3 \pm 0,24	1,2 \pm 0,19	1,4 \pm 0,25	0,31 \pm 0,12	0,23 \pm 0,16	0,42 \pm 0,14
4	8,4 \pm 0,61	8,7 \pm 0,56	8,9 \pm 0,73	3,1 \pm 0,41	3,61 \pm 0,36	4,14 \pm 0,39
6	15,2 \pm 1,73	16,8 \pm 1,87	16,5 \pm 1,64	4,23 \pm 0,39	4,39 \pm 0,39	4,61 \pm 0,57
8	25,9 \pm 2,3	26,1 \pm 7,92	26,5 \pm 2,12	6,32 \pm 0,71	7,1 \pm 0,83	6,78 \pm 0,49

Concentrations d' α -amylase exprimées en PS 50 ml^{-1} .

Le test t n'a pas permis de déceler de différences significatives entre les valeurs relevées avec et sans Na F, ceci pour les deux souches étudiées. Le taux de probabilité envisagé était de 1%.

Les résultats du tableau 21 montrent que l'addition de Na F tant chez la souche BrBv IV que chez la souche 1135 n'apporte aucune amélioration de la production de l' α -amylase. MALKOV et DEEVA (1961) suggèrent que ce composé pourrait éprouver vis à vis de certains organismes des difficultés à franchir la membrane cytoplasmique.

IV - C O N C L U S I O N

La nature des parois hyphales des champignons étant sujette à une grande variabilité, nous avons dans un premier temps élaboré une méthode d'isolement des protoplastes permettant d'obtenir pour les deux souches une lyse rapide du mycélium associée à un rendement élevé. Une fois ce protocole mis en place, restait à vérifier l'intégrité physiologique des protoplastes obtenus. L'étude de certaines enzymes clefs du métabolisme intermédiaire ainsi que la mesure des QR a démontré que les protoplastes présentaient des propriétés semblables au mycélium, avec toutefois une légère réserve concernant le niveau d'activité. Nous avons en effet constaté une perte d'activité de ces enzymes ainsi qu'une baisse sensible des QR en fonction du temps de digestion lytique. Par contre, la régénération des protoplastes est, quant à elle, affectée positivement par ce facteur. D'après ISAAC (1978), ces observations seraient liées à l'hétérogénéité structurale du mycélium ; les premiers protoplastes formés proviennent en effet des extrémités apicales du mycélium et sont pour la plupart de faible taille et non vacuolés. Pour ISAAC, 50% de ces protoplastes seraient anucléés. Après 4 heures d'incubation lytique, on note par contre un accroissement de la taille ainsi que la présence de vacuole.

Ces travaux préliminaires ont cependant permis de démontrer que malgré leur hétérogénéité structurale, les protoplastes gardaient des propriétés physiologiques similaires à celles du mycélium d'origine.

A partir de cette certitude, nous avons abordé l'étude de la régulation de la synthèse de l' α -amylase. L'emploi d'inhibiteur de la transcription a permis d'établir que cette synthèse était inductible et faisait donc appel à la synthèse de nouveaux m ARN, bien qu'après quelques heures d'incubation la production d' α -amylase semble essentiellement le fait d'une traduction de ces m ARN.

La synthèse de l' α -amylase étant inductible et ce chez les deux souches, il était permis de penser que la faible production de cette enzyme observée chez la souche 1135 résultait de difficultés à transcrire ou à traduire ces nouveaux m ARN. C'est ce que nous avons cherché à travers l'étude de la répression catabolique exercée par le glucose sur cette synthèse. De l'analyse des résultats obtenus il ressort que le glucose réprime de façon marquée la synthèse de l' α -amylase chez la souche BrBv IV, répression qui s'est révélée comparativement beaucoup moins importante chez la souche 1135.

L'apport externe d'AMPc, composé capable de lever une telle répression, confirme par ailleurs ces résultats puisqu'il rétablit chez la souche BrBv IV la production d' α -amylase à son niveau observé sur maltose seul et diminue l'accumulation de l'acide malique, alors que chez la souche 1135 son action s'avère nulle.

La répression catabolique imposée par le glucose sur le métabolisme de la souche BrBv IV est donc à la base de l'acidification des milieux de culture et de la faible synthèse d' α -amylase enregistrée dans ces conditions.

La souche 1135 présente par contre constamment ce type de comportement, dont l'origine doit être recherchée au niveau de ses caractères génétiques.



CONCLUSION GÉNÉRALE

En confiant ce travail au laboratoire de Cryptogamie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille la Société Rapidase désirait éclairer les rapports liant la synthèse d' α amylase chez *A. oryzae* à l'acidification des milieux de culture rencontrée occasionnellement lors de cette fermentation. Cette chute de pH étant synonyme d'une baisse de production, l'objectif d'une telle étude était de déterminer les méthodes susceptibles d'éliminer ce risque.

Une première approche de ce problème avait permis par une étude comparée de deux souches *A. oryzae* de poser les problèmes relatifs à cette synthèse. Selon MALARD (1981) un métabolisme de type oxydatif serait favorable à la synthèse d' α amylase alors qu'un métabolisme de type réducteur au contraire entrainerait l'accumulation de composés acides aux dépens de cette synthèse.

Partant de cette hypothèse, notre premier souci fut d'identifier le ou les composés acides relargués dans les milieux de culture.

Il s'est avéré que pour les deux souches l'acide malique était responsable de la chute de pH enregistrée après 48 heures de culture, en fin de croissance nous avons également noté la présence d'acide α céto-glutarique. Pour élucider les éventuels liens existants entre cette accumulation d'acides organiques et la production d' α amylase nous nous sommes attachés à déterminer la nature des voies métaboliques responsables de cette acidification.

Nous avons démontré que l'acide α céto-glutarique s'accumulait suivant un processus commun aux deux souches, processus impliquant d'une part le glutamate de sodium composé entrant en forte concentration dans les milieux de culture et d'autre part la déficience de l' α céto-glutarate déshydrogénase. Une partie de cet acide α céto-glutarique participe également à l'accumulation de l'acide malique mais nous avons vu que cette participation restait minoritaire.

Si l'accumulation de l'acide malique résulte également d'un mécanisme commun aux deux souches, nous avons par contre démontré que les causes en sont profondément différentes. Pour des raisons qui leur sont propres les souches BrBv IV et 1135 ne peuvent dans certaines conditions régénérer le NADH cytoplasmique par voie aérobie. Ce qui dans notre cas précis impose à ces deux souches la réoxydation du NADH par la malate déshydrogénase via la carboxylation en oxaloacétate de composés à trois atomes de carbone issus de la glycolyse. Aucune réaction n'étant susceptible de métaboliser rapidement le malate ainsi formé, celui-ci est accumulé et relargué dans les milieux de culture.

Chez la souche 1135, cette incapacité à réoxyder l' NADH exogène serait dû à son taux naturellement faible en enzymes NADH oxydase et NADH cytochrome c oxydoréductase alors que chez la souche BrBv IV le glucose présent dans les milieux de culture serait à l'origine de cette accumulation. Son action répressive sur les voies respiratoires conduit la souche BrBv IV à utiliser un moyen de réoxydation de l' NADH identique à la souche 1135. La production d' α amylase qui fait appel à une synthèse de novo d'm ARN est également affectée chez la souche BrBv IV par la présence de glucose alors que chez la souche 1135 cette synthèse reste faible quelque soit le substrat utilisé.

Cette souche apparait donc comme un matériel peu propice à l'amélioration de la synthèse de l' α -amylase alors que chez la souche BrBv IV plusieurs méthodes peuvent être envisagées dans ce but.

Cette souche utilisée industriellement est particulièrement sensible à la répression catabolique exercée par le glucose, or les substrats utilisés en fermentation sont des polysaccharides dont la décomposition entraîne la formation de glucose. Ce glucose réduit la synthèse de l' α -amylase et provoque une chute de pH. Une sélection de mutant insensible à la répression catabolique pourrait être opérée par l'usage d'un composé tel que le 2-déoxyglucose et ainsi améliorerait de façon sensible la production de l'enzyme.

On peut également envisager l'apport du substrat à un taux limitant de façon à maintenir la concentration en glucose libre aussi faible que possible.

L'oxygène dissout nous l'avons vu joue un rôle déterminant dans l'accumulation des acides organiques, l'aération devra donc être ajustée pour favoriser une production d' α -amylase optimum associée à une accumulation d'acides organiques minimum.

La fusion des protoplastes déjà abordée par notre laboratoire pourra être utilisée pour amplifier le potentiel génétique de la souche BrBv IV.

L'incorporation à ces protoplastes de mitochondries de souches insensibles à la répression catabolique serait également d'un grand intérêt tant un niveau fondamental que dans ses implications industrielles.



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

- ADAMS P.R., 1981.- Amylase production by *Mucor pusillus* and *Humicola lanuginosa* as related to mycelial growth. *Mycopathologia* 76 : 97-101.
- AL-GHARAWI A. et D. MOORE, 1974.- Effects of D-glutamate on mycelial growth and glutamate deshydrogenase enzymes of *Coprinus lagopus*. *J. gen. Microbiol.* 85 : 274-282.
- ANDRZEJCZUK-HYBEL J. et J. KACZKOWSKY, 1971a.- Conditions and course of accumulation and excretion of amylase in culture of *Aspergillus oryzae*. *Bull. Acad. Polonaise des Sc.* 19 : 313-316.
- ANDRZEJCZUK-HYBEL J. et J. KACZKOWSKY, 1971b.- The purification and preliminary characterization of *Aspergillus oryzae* CLPS Amylases. *Bull. Acad. Polonaise des Sc.* 19 (7-8) : 451-457.
- BARTNICKI-GARCIA S., 1970.- Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny. *Phytochemical phylogeny* 81-103 Edit. par J. B. HASBORNE. Acad. press. Inc., New-York, London.
- BAUTISTA J., J. SATRUTEGUI et A. MACHADO, 1979.- Evidence suggesting that the NADP/NADPH ratio modulates the splitting of the isocitrate flux between the glyoxylic and tricarboxylic cycles in *FEBS Lett.* 105 : 333-336.

- BEEVER R.E., 1973.- Pyruvate carboxylase and *N. crassa* suc mutants. *Neurospora Newsletter* 20 : 15-16.
- BLUMENTHAL H., 1965.- Glycolysis. *The fungi* 1 : 229-268. Edit. par G.C. Ainsworth et A.S. Sussman. New-york, London. Acad. Press.
- BOTHAM P.A. et C. RATLEDGE, 1979.- A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organisms. *J. gen. Microbiol.* 114 : 361-375.
- BRUINENBERG P.M., J.P. VAN DIJKEN et W.A. SCHEFFERS, 1983a.- A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. *J. gen. Microbiol.* 129 : 953-964.
- BRUINENBERG P.M., J.P. VAN DIJKEN et W.A. SCHEFFERS, 1983b.- An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. *J. gen. Microbiol.* 129 : 965-971.
- BULL A.T., 1970a.- Inhibition of polysaccharide by melanin. Enzyme inhibition in relation to mycolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 137 : 345-356.
- BULL A.T., 1970b.- Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. *J. gen. Microbiol.* 63 : 74-94.
- CASSELTON , 1976.- Anaplerotic pathways. *The filamentous fungi* 2 : 121-136. Edit. par J.E. Smith et D.R. Berry. Edward Arnold.
- COMBEPINE G. et G. TURIAN, 1967.- Métabolisme de la glycine et conidiation du *Neurospora crassa*. *Path. Microbiol.* 30 : 953-958.
- COOPER T.G. et C.R. BENEDICT, 1968.- Regulation of pyruvate carboxylase by coenzyme. A and acyl coenzyme A. thioesters. *Biochemistry* 7 : 3032-6.
- DEPREZ J., 1977.- Rapport de travail sur *Aspergillus oryzae*. Laboratoire de Cryptogamie, Université de Lille I.
- DE VRIES O.M.H. et J.G.H. WESSELS, 1973a.- Effectiveness of a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride* in releasing spheroplasts from fungi, particularly basidiomycetes. *Anton. Leeuwenhoek. J. Microbiol.* 39 : 397-400.
- DE VRIES O.M.H. et J.G.H. WESSELS, 1972.- Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride*. *J. gen Microbiol.* 73 : 13-22.
- DE VRIES O.M.H. et J.G.H. WESSELS, 1973b.- Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by combined action of purified α -1,3-glucanase and chitinase derived from *Trichoderma viride*. *J. gen Microbiol.* 76 : 319-330.
- DE WAARD M.A., 1976.- Formation of protoplasts from *Ustilago maydis*. *Anton. Leeuwenhoek. J. Microbiol.* 42 : 211-216.
- DURR M., T. BOLLER et A. WIEMKEN, 1975.- Polybase induced lysis of yeast spheroplasts. *Arch. Microbiol.* 105 : 319-327.
- FARKAS V., 1979.- Biosynthesis of cell walls of fungi. *Microbiol. Rev.* 43 (2) : 117-144.

- FAYRET J., 1975.- Etude du cycle de reproduction du *Gnomonia leptostyla* (Fr) Ces et de Nat. Déterminisme et physiologie. Thèse, Toulouse 296p.
- FEIR H.A. et I., SUZUKI, 1969.- Pyruvate carboxylase of *Aspergillus niger* : kinetic study of a biotin-containing carboxylase. *Canadian J. of Biochem.* 47 : 697-710.
- FERENCZY L. F. KEVEI et J. ZSOLT, 1974.- Fusion of fungal protoplasts. *Nature, London* 248 : 793-794.
- FERENCZY L. F. KEVEI et M. SZEGEDI, 1975.- High Frequency Fusion of Fungal Protoplasts. *Experientia* 31 : 1028-1030.
- FERENCZY L., F. KEVEI, M. SZEGEDI, A. FRANKO et I. ROJIK, 1976.- Factors affecting high frequency fungal protoplast fusion. *Experientia* 32 : 1156-1158.
- FIECHTER A., G.F. FUHRMANN et O. KAPPELI, 1981.- Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Advances in Microbial physiology* 22 : 123-183. Edit. par A.H. Rose. London, New-york Acad. Press.
- FINCHAM J.R.S., 1962.- Genetically determined multiple forms of glutamic deshydrogenase in *Neurospora crassa*. *J. Molecular Biology* 4 : 257-274.
- FLAVELL R.B. et J.R.S. FINCHAM, 1968.- Acetate non-utilizing mutants of *Neurospora crassa*. II. Biochemical deficiencies and the role of certain enzymes. *J. Bacteriol* 95 : 1063-1068.
- FLAVELL R.B. et D.D. WOODWARD, 1970.- The concurrent regulation of metabolically related enzymes. The Krebs cycle and glyoxylate enzymes in *Neurospora*. *Eur. J. Biochem.* 17 : 284-291.
- FOURY F. et GOFFEAU, 1973.- Combination of 2 deoxyglucose and snailgut enzyme treatments for preparing sphaeroplasts of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. gen Microbiol.* 75 : 227-229.
- GEALT M.A., G. SHEIR-NEISS et N.R. MORRIS, 1976.- The isolation of nuclei from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J. gen Microbiol.* 94 : 204-210.
- GIBSON R.K. et J.F. PEBERDY, 1972.- Fine structure of protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *J. gen Microbiol.* 72 : 529-538.
- HARDING R.W., D.F. CAROLINE et R.F. WAGNER, 1970.- The pyruvate deshydrogenase complex from the mitochondrial fraction of *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 138 : 653-661.
- HOLZER H., 1976.- Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 1 : 178-181.
- HORECKER B.L., 1962.- Pentose metabolism in bacteria. New-york, John Wiley and Sons. 100.

- HYNES M.S., 1974.- The effects of ammonium, L-glutamate and L-glutamine on nitrogen catabolism in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol* 120 : 116-123.
- IKEDA Y., K. NAKAMURA, K. UCHIDA et C. ISHITANI, 1957.- Two attempts upon improving an industrial strain of *Aspergillus oryzae* through somatic recombination and polyploidization. *J. gen. Appl. Microbiol.* 3 (2) : 93-101.
- INGEBRETSEN O.C., 1975.- Properties of the Nicotinamide Ademine Dinucleotide Phosphate-Specific Isocitrate deshydrogenase from *Blastocladiella ernersonii*. *J. Bacteriol* . 124 : 65-72.
- ISAAC S., 1978.- Biochemical properties of protoplasts from *Aspergillus nidulans*. *PhD thesis Univ. Nottingham, England* 283p.
- ISAAC S. et A.V. GOKHALE, 1983.- Respiration of protoplasts isolated from *Aspergillus nidulans*. *6th International Protoplast Symposium* 334-335.
- ISHITANI C. et K. SAKAGUCHI, 1955a.- Hereditaty variation and genetic recombination in KOJI MOLDS (*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*) : I. Natural variation. *J. gen. Microbiol.* 1 (4) : 246-257.
- ISHITANI C. et K. SAKAGUCHI, 1955b.- Hereditary variation and genetic recombination in KOJI MOLDS (*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*) : II. Morphological mutations. *J. gen. appl. Microbiol.* 1 (4) : 258-271.
- JOHNSTON I.R., 1965.- The composition of the cell wall of *Aspergillus niger*. *Biochem. J.* 96 : 561-658.
- KEVEI F. et J.F. PEBERDY, 1977.- Interspecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. *J. gen. Microbiol.* 102 : 255-262.
- KEVEI F. et J.F. PEBERDY, 1979.- Induced segregation in interspecific hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. *Molec. gen. Genet.* 170 : 213-218.
- KINGHORN J.R. et J.A. PATEMAN, 1973.- NAD and NADP L-glutamate deshydrogenase activity and ammonium regulation in *Aspergillus nidulans*. *J. gen. Microbiol.* 78 : 39-46.
- KINGHORN J.R. et J.A. PATEMAN, 1974.- The regulation of NAD L-glutamate deshydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research, Cambridge.* 23 : 119-124.
- KORNBERG H.L., 1966.- The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 99 : 1-11.
- KORNBERG H.L. et N.B. MADSEN, 1957.- Synthesis of C4-dicarboxylic acids from acetate by a glyoxylate bypass of the tricarboxylic acid cycle. *Biochem. Biophys. Acta.* 24 : 651-653.

- KOZYRIOVA G.T., 1971.- Regulation of formation of amylase in *Aspergillus oryzae*. *Westn. Mesk. Univ. ser. 6 biol. Pochvoved* 26 (4) : 115-116.
- KRITZMAN G., I. CHET et Y. HENIS, 1977.- Effect of carbon dioxide on growth and carbohydrate metabolism in *Sclerotium rolfsii*. *J. gen. Microbiol.* 100 : 167-175.
- KUNDU A.K. et S. DAS, 1970.- Production of amylase in liquid culture by a strain of *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol.* 19 (4) : 598-603.
- KUNDU A.K., S. DAS et T.K. GUPTA, 1972.- Influence of culture and nutritional conditions on the production of amylase by the submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. technol.* 51 (2) : 142-150.
- MA H., C.P. KUBICEK et M. ROHR, 1982.- Malate deshydrogenase isoenzymes in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Let.* 12 : 147-151.
- MAHLER H.R. et C.C. LIN, 1978.- Exogenous adenosine 3', 5' monophosphate can release yeast from catabolite repression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83 : 1039-1047.
- MALARD P., 1981.- Contribution à l'étude de la production d' α amylase par *Aspergillus oryzae*. (Alb.) cohn. *These de troisième cycle.* 133p.
- MALKOV A.M. et V.E. DEEVA, 1961.- Effect of the partial inhibition of respiration in the fungus *Aspergillus oryzae* on the synthesis of biomass, P. content and amylolytic activity. *Microbiologyia* 30 : 229-235.
- MAXWELL, D.P. et D.F. BATEMAN, 1968.- Oxalic acid biosynthesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology.* 58 : 1635-1642.
- MEGRAW R.E. et R.S. BEERS, 1964.- Glyoxylate metabolism growth and sporulation of *Bacillus cereus*. *J. of Bacteriol.* 87 (5) : 1087-1093.
- MEYRATH J., 1975.- Interdependance of inoculum size, method of cultivation and substrate composition in amylase production and growth of *Aspergillus oryzae*. *Zbl. Balet. Abt. II,* 119 : 53-73.
- MONOD J., J. WIMAN et J.P. CHANGEUX, 1965.- On the nature of allosteric transition. A plausible model. *J. Molecular Biology* 12 : 88-118.
- MUSILKOVA M. et Z. FENCL, 1968.- Some factors affecting the formation of protoplasts in *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica.* 13 : 235-239.
- NEWBURGH et V.H. CHELDELIN, 1958.- Glucose oxydation in mycelia and spores of the wheat stink fungus *Tilletia caries*. *J. Bacteriol.* 76 : 308-311.
- NG W.S., J.E. SMITH et J.G. ANDERSON, 1972.- Change in carbon catabolic pathways during synchronous development of *Aspergillus niger*. *J. gen. Microbiol.* 71 : 495-504.

- NG M.L., J.E. SMITH et A.F. Mc INTOSH, 1973.- Changes in activity of tri-carboxylic acid cycle and glyoxylate cycle enzymes during synchronous of *Aspergillus niger*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 61 : 13-20.
- OCHOA S., 1948.- Biosynthesis of tricarboxylic acids by carbon dioxide fixation . II. Enzymatic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 174 : 133-157.
- O'CONNELL B.T. et J.L. PAZNOKAS, 1980.- Cylyoxylate cycle in *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.* 143 (1) : 416-421.
- OSMANI S.A. et M.C. SCRUTTON, 1981.- Activation of pyruvate carboxylase from *Aspergillus nidulans* by acetyl.coenzyme A. *Febs. Lett. Vol.* 135 n°2 : 253-257.
- PALL M.L., 1981.- Adenosine 3',5' - phosphate in fungi. *Microbiol. Reviews.* 45 : 462-480.
- PASTAN L. et S. ASHYA, 1976.- Cyclic adenosine 3',5' - monophosphate in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 40 : 527-551.
- PATEMAN J.A., 1969.- Regulation of synthesis of glutamate deshydrogenase and glutamine synthetase in microorganisms. *Biochem. J.* 115 : 768-775.
- PEBERDY J.F., 1979.- Fungal protoplasts : isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* 33 : 21-39.
- PEBERDY J.F., 1980.- Protoplast fusion - a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.* 2 : 23-29.
- PEBERDY J.F. et S. ISAAC, 1976.- An improved procedure for the isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans*. *Microbios letters.* 3 : 7-9.
- PEBERDY J.F. et R.K. GIBSON, 1971.- Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *J. gen Microbiol.* 69 : 325-330.
- PEBERDY J.F., C.E. BUCLEY, P.C. DALTRY et P.M. MOORE, 1976.- Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. *Trans. Br. mycol. Soc.* 67 : 23-26.
- PETERKOFISKY A., 1977.- Regulation of *Escherichia coli* adenylate cyclase by phosphorylation dephosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 12-14.
- PEREA J. et C. GANCEDO, 1982.- Isolation and characterization of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective in phosphoenolpyruvate carboxykinase . *Arch. Microbiol.* 132 : 141-143.
- PLAUT G.W.E., 1963.- Isocitrate deshydrogenase. *The enzymes* 7 : 105-126. *Edit. par Boyer et coll. Acad. Press. New-york.*
- ROSENBERGER R.F., .- The cell wall. *Filamentous fungi* 2. 328-344. *Edit. par J.E. Smith and D.R. Berry. Edward Arnold.*
- RUFFO A.E., E. TESTA, A. ADINOLFI et G. PELIZZA, 1962.- Control of the citric acid cycle by glyoxylate I. A new inhibitor of aconitase formed by the condensation of glyoxylate with oxaloacetate. *Bioch. J.* 85 : 588-593.

- SCRUTTON M.C., 1971.- Assay of enzymes of CO₂ metabolism. *Methods in Microbiology* 6, A : 479-541. Edit. par J.R. Norris et D.W. Ribbons. London Acad. Press.
- SCRUTTON M.C. et M.R. YOUNG, 1972.- Pyruvate carboxylase. *The enzymes* Vol. 6 : 1-35. Edité par P.D. BOYER New-York : Academic Press.
- SIEBERT D. et G. SCHULTZ, 1979.- Citric acid production by fermentation. *International Microbiology and Food Industry Congress. (APRIA)* D 44 : 1-39.
- SMITH R.A. et I.C. GUNSALUS, 1955.- Distribution and formation of isocitratase. *Nature*. 175 : 774-775.
- SMITH J.E. et J.C. GALBRAITH, 1971. Biochemical and physiological aspects of differentiation in fungi. *Advance in Microbiol. Physiology*. 5 : 45-134.
- SOMASUNDARAM T, K. CHANDRASEKARAN, J. TAYARAMAN et C. RAJAMANICKAM, 1980.- Role of cyclic AMP in mitochondriogenesis in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 92 : 655-661.
- TACHIBANA S. et T. MURAKAMI, 1974.- Effects of carbon dioxide sources and other compounds on L-malate fermentation utilizing ethanol. *J. ferm. Technol.* 52 : 353-359.
- THOM Ch. et K.B. RAPER, 1945.- *Manual of the Aspergilli, The Williams and Wilkins Company.*
- THORN M.B., 1953.- Inhibition by malonate of succinic deshydrogenase in heart-muscle preparation. *Biochem. J.* 54 : 540-547.
- TRINCI A.P.J., 1978.- Wall and hyphal growth. *Sci. Prog. London.* 65 : 75-99.
- TONOMURA K., H. SUZUKI, N. NAKAMURA, K. KURAYA et O. TANABE, 1961.- On the inducers of α amylase formation in *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.* 25 (1) : 1-6.
- TONOMURA H., F. FUTAI et O. TANABE, 1963.- Cell bound α amylase in *Aspergillus oryzae*. 2. Stimulation of α amylase liberation with phosphopeptids. *Rep. Ferment. Res. Inst.* 24 : 35-43.
- TURIAN G., 1960a.- Déficiences du métabolisme oxydatif et différenciation sexuelle chez *Allomyces* et *Neurospora*. Activité d'une DPN-deshydrogénase lactique chez *Allomyces*. *Path. Microbiol.* 23 : 687-699.
- TURIAN G., 1960b.- Indices d'un fonctionnement compensatoire du cycle glyoxylique lors de la différenciation mâle chez *Allomyces* et *Neurospora*. *Bull. Soc. Bot. Suisse* 70 : 451-458.
- TURIAN G., 1961.- Cycle glyoxylique, transaminase alanine-glyoxylate et différenciation sexuelle chez *Allomyces* et *Neurospora*. *Pathologia et Microbiologia* 24 : 819-839.
- TURIAN G., 1963.- Sur le mécanisme de l'induction isocitratasique chez *Allomyces* et *Neurospora*. *Path. Microbiol.* 26 : 553-563.

- TURIAN G., 1970.- Aspects biochimiques de la différenciation fongique (modele *Neurospora*). *Physiol. Veget.* 8 : 375-386.
- TURIAN G. et G. COMBEPINE, 1963.- Activité comparée de la transaminase alanine-glyxoylate de *Neurospora* cultivée en présence de saccharose ou d'acétate. *Helvetica Chimica Acta.* XLVI (6) : 2453-2457.
- VALLIER P., J. BATA et L. COLOBERT, 1977.- Conditions optimales de production d' α amylase en milieu liquide par *Aspergillus oryzae*. *Ann. Microbiol.* 128b : 359-371.
- VANDENBROEK H.W.J., H.G. STUNNENBERT et C.M.J. WENNEKES, 1979.- Protoplasts from *Aspergillus nidulans*. *Microbios* 26 (104) : 115-128.
- VIDAL P. et MACHADO A., 1977.- Isocitrate deshydrogenase of *Tetrahymena pyriformis*. *Mol. Cell. Biochem.* 17 : 151-156.
- VILLANUEVA J.R. et I. GARCIA ACHA, 1971.- Production and use of fungal protoplasts. *Methods in Microbiology.* 4 : 665-718. Edit. par C. Booth. London, New-york. Acad. Press.
- VAN WIJK R., J. OUWEHAND, T. VAN DEN BOS et V.V. KONINGSBERGER, 1969.- Induction and catabolite repression of α glucosidase synthesis in protoplasts of *saccharomyces carlsbergensis*. *Biochem. Biophysic. Acta.* 186 : 178-194.
- WATSON K. et J.E. SMITH, 1967.- Oxidative phosphorylation and respiratory control in mitochondria from *Aspergillus niger*. *Biochem. J.* 104 : 332-339.
- WATSON K., W. PATON et J.E. SMITH, 1969.- Oxydative phosphorylation and respiratory control in mitochondria from *Aspergillus oryzae*. *Can. J. Microbiol.* 15 : 975-977.
- WISEMAN A. et T.K. LIM, 1975.- Remol of glucose repression of α -glucosidase synthesis in yeast protoplasts by adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate addition and its prevention by chloramphenicol. *Biochem. Soc. Trans.* 2 : 932-937.
- WISEMAN A. et T.K. LIM, 1977.- Adenosine 3', 5'-monophosphate in lifting of glucose repression of α glucosidase by fluoride in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* 5 : 970-973.
- YABUKI M. et S. FUKUI, 1970.- Presence of binding site for α -amylase and of masking protein for this site on mycelial cell wall of *Aspergillus oryzae*. *J. Bacteriol.* 104 (1) : 138-144.
- YABUKI M., N. ONO, K. HOSHINO et S. FUKUI, 1977.- Rapid induction of α -amylase by non-growing mycelia of *Aspergillus oryzae*. *Appl. environment. Microbiol.* 34 (1) : 1-6.
- YURKEVITCH V.V. et G.T. KOZYRIOVA, 1967.- Participation de la protéine enzymatique active dans la régulation de sa formation. *Dokl. Akad. Nauk.* 177 (1) : 240-242.

YURKEVITCH V.V. et G.T. KOZYRIOVA, 1972.- Rôle de la paroi cellulaire dans la régulation de la biosynthèse de l' α -amylase chez *Aspergillus oryzae*. Dokl. Akad. Nauk. 204 (3) : 740-743.

ZONNEVEL B.J.M., 1976.- The effects of glucose and manganese on adenosine 3', 5'-monophosphate levels during growth and differentiation of *Aspergillus nidulans*. Arch. Microbiol. 108 : 41-44.

SOMMAIRE DES ANNEXES TECHNIQUES

Annexe n° 1 : Milieu de culture	A1
Annexe n° 2 : Chromatographie	A5
Annexe n° 3 : Extraction et dosage des nucléotides pyrimidiques	49
Annexe n° 4 : Recherche et dosage des activités enzymatiques	A12
Annexe n° 5 : Isolement des mitochondries	A17
Annexe n° 6 : Mesure des coefficients respiratoires	A18
Annexe n° 7 : Dosages de composés par voie chimique	A21
Annexe n° 8 : Dosages de composés par voie enzymatique	A24

BIBLIOGRAPHIE TECHNIQUE

ANNEXE TECHNIQUE N° 1

MILIEU DE CULTURE

A/ - Aspergillus

Au laboratoire, la conservation des souches préalablement incubées à 28°C s'effectue à 18°C en tube 25/200 contenant 20ml de milieu nutritif gélosé.

Plusieurs milieux ont été utilisés à cet effet :

- milieu Czapek modifié par remplacement du phosphate bipotassique par le monopotassique et par addition d'extrait de levure.

saccharose	30 g
extrait de levure	5 g
Na NO ₃	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl	0,5 g
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0,5 g
Fe SO ₄ 7H ₂ O	0,01 g
eau distillée	1000 ml
pH 6	

- milieu de Yabuki (1977)

glucose	10 g
neopeptone (difco)	5 g
extrait de malt	3 g
extrait de levure	3 g
eau distillée	1000 ml
pH 5,5	

Lorsqu'à des fins d'expérience une sporulation rapide (3 jours) et abondante était nécessaire, nous avons utilisé les milieux suivants :

- milieu P.D.A.

20 g de pomme de terre sont placés dans 1 litre d'eau distillée et portés à ébullition ; après refroidissement, le milieu est filtré. Après addition de 10 g de glucose, le pH est stabilisé à 5,5.

- milieu "V8 Juice"

V8 Juice Campbells Soup 250 ml
 eau distillée 250 ml
 pH 5,5

Ce dernier milieu proposé par MILLER (1955) a été le plus couramment utilisé pour la production des spores. Nous l'avons utilisé principalement en fiole de Roux contenant 100 ml de ce milieu, la culture s'opérant à 28°C.

L'ensemencement des milieux liquides à partir des milieux gélosés est effectué de la manière suivante : à une fiole de Roux sont ajoutés 30 ml d'eau distillée stérile et une vingtaine de billes de 3 mm de diamètre. Après avoir agité les fioles pour détacher les conidies, celles-ci sont séparées des débris mycéliens par filtration sur coton de verre. La densité de la suspension est alors évaluée à l'hématimètre (PETIT SALUMBENI) puis ajustée à la densité désirée : 10^5 conidies ml^{-1} pour la production d' α -amylase, 10^8 conidies ml^{-1} pour la production de mycélium. Un millilitre de cette suspension est alors utilisé pour l'ensemencement de chaque fiole.

La production d' α -amylase, tout comme la production de mycélium, s'effectue en fiole d'Ertenmeyer de 1 litre contenant 200 ml de ce milieu liquide, l'incubation se fait sur une table à agitation Biolafitte à 140 tr/mn à 30°C.

Le dosage de l' α -amylase s'effectue suivant la technique énoncée dans l'annexe technique n° 4.

La croissance est mesurée par la méthode des poids de matière sèche et exprimée en grammes par litre de milieu de culture. Pour cela, nous avons procédé de la façon suivante. Le contenu de chaque fiole est filtré sous vide sur un filtre DURIEUX n° 111 sous couche et placé dans une boîte à tare dont le poids ainsi que celui du filtre ont été préalablement déterminés après passage à 105°C pendant 24 heures, puis refroidissement dans un dessiccateur. Après un nouveau passage à l'étuve à 105°C pendant 24 heures, puis un refroidissement dans les mêmes conditions, l'ensemble boîte, filtre et mycélium sec est alors pesé et le poids de matière sèche calculé par différence. Pour chaque expérimentation, la moyenne de trois fioles de culture a été mise comme valeur finale.

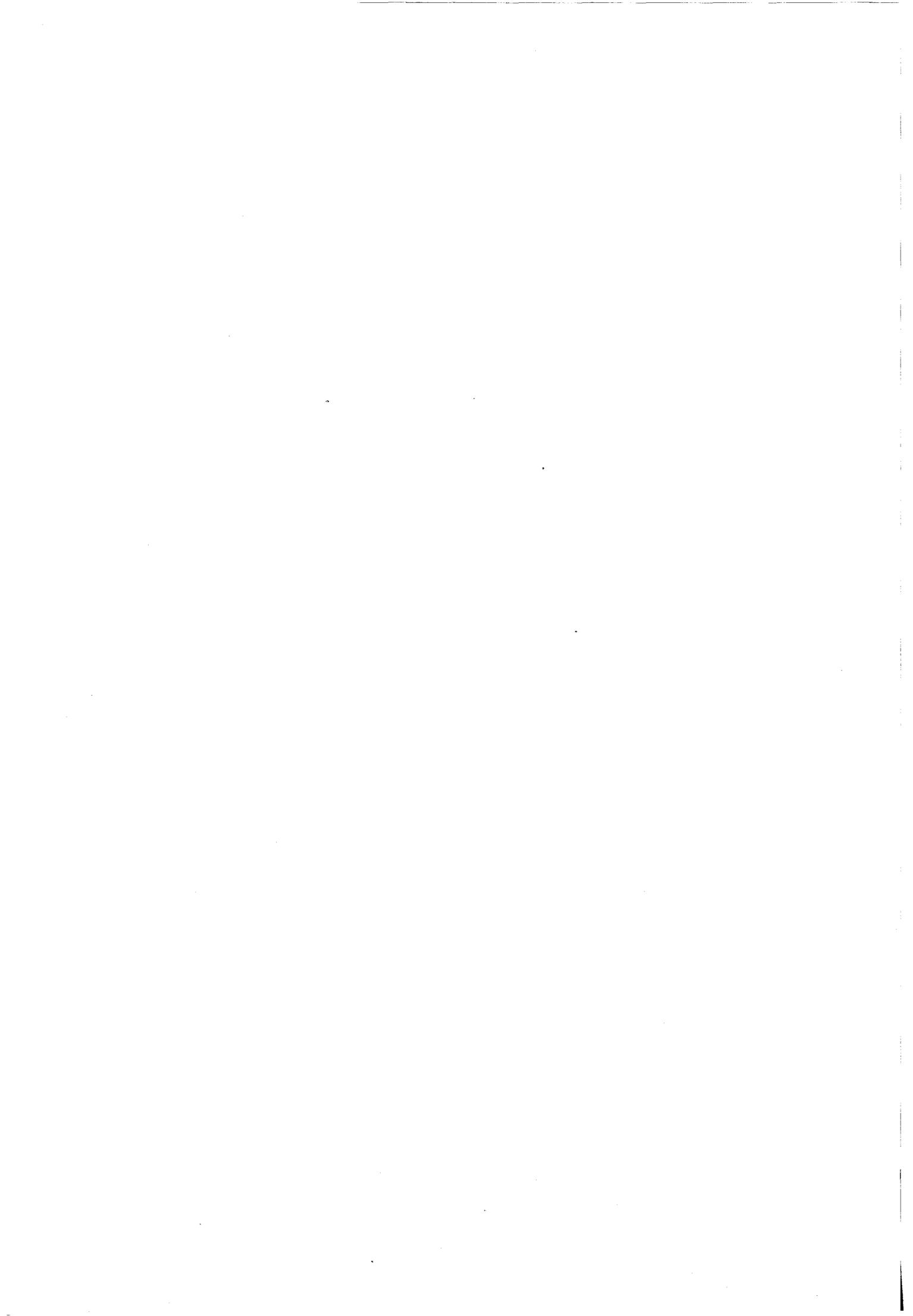
B/ - *Trichoderma harzianum*

Pour la préparation du complexe lytique, nous avons utilisé une souche provenant de la nycothèque du Muséum National d'Histoire Naturelle sous la référence : Leg ENSA Montpellier.

Le milieu de culture et de conservation adopté comme base de l'étude est celui proposé par MALARD (1981) :

saccharose	3 g
chitine	5 g
parois hyphale	5 g
Na NO ₃	2 g
KM ₂ PO ₄	1 g
Mg SO ₄ , ZH ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
Fe SO ₄ , 7H ₂ O	0,01 g
eau distillée	1000 ml
pH 6	

La conidiogénèse de *Trichoderma harzianum* étant photoactivée (GALUNET et GRESSEL, 1966), les cultures sur milieu gélosé en fiole de Roux sont placées sous un éclairage énergétique 750 μ W/cm² et cela à 28°C. La production d'enzymes lytiques est réalisée en Erlenmeyer de 1 l, contenant 300 ml de milieu inoculé par une suspension conidienne de 10⁸ spores. L'agitation est effectuée sur une table Biolafitte à 140 tr/mn à 28°C. Après trois jours d'incubation, le milieu de culture est séparé du mycélium par filtration sur filtre DURIEUX n° 111 sans cendre. Après 20 mn de centrifugation à 10000 g à 4°C, le surnageant est réduit six fois à l'évaporateur rotatif à 28°C, puis filtré sur membrane millipore.



ANNEXE TECHNIQUE N° 2

CHROMATOGRAPHIE

A/ Chromatographie couche mince- Préparation des plaques

15 g de poudre de cellulose microcristalline sont mélangés dans un Waring Blender avec 90 ml d'eau distillée pendant 30 à 45 secondes. Avant d'étaler, le pH est ajusté entre 11 et 11,5. La cellulose est ensuite coulée en couche de 0,25 mm d'épaisseur sur plaque de verre de 20 x 20 cm. Les plaques ainsi préparées sont séchées pendant 24 heures à l'air libre.

- Développement

La séparation est réalisée pendant environ 3 heures. La plaque est ensuite séchée 30 minutes dans un courant d'air froid avant d'être révélée.

Les systèmes éluant sont ceux proposés par RANDERATH (1971) :

- 1 - éthanol 98% / ammoniaque 25% / eau (8 : 2 : 1)
- 2 - isobutanol / acide formique 5N (2 : 3).

- Détection

Le révélateur est une solution de vert de bromocrésol (0,04% dans l'isopropanol) ajustée à pH 7 à l'aide de Na OH 2N. Les tâches apparaissent jaunes sur fond bleu-vert. Suivant les fractions acides, la sensibilité est de 2 à 10 µg.

B/ Dosage des acides organiques dans les filtrats de culture par CLHP

Les acides organiques présents dans les filtrats de culture ont été purifiés suivant la technique légèrement modifiée de STUMPF et BURRIS (1979).

- Préparation des résines échangeurs d'ions

Les résines Dowex 1 - x 8 et Dowex 50 - x 8 sont lavées à l'acétone, au méthanol, puis abondamment rincées à l'eau distillée, ceci pour éliminer les contaminants colorés solubles. La résine Dowex 1 - x 8 (Cl^-), 200 - 400 mesh, est convertie sous forme COO^- . La résine Dowex 50 - x 8 (H^+), 200 - 400 mesh, est utilisée sous cette forme.

- Construction de la colonne

Nous avons utilisé des seringues jetables de 1 ml auxquelles nous avons adapté à la place de l'aiguille un embout de pipette automatique Gibson P 200. Entre cet embout et la seringue, nous avons intercalé un filtre en toile à bluter.

Dans chaque seringue sera placé le mélange approprié de résine soit 0,5 ml de Dowex 50 ou 0,3 ml de Dowex 1. La colonne Dowex 50 (chargée de fixer les acides aminés) est alors placée sur la colonne Dowex 1, sur cet assemblage sera placée une seringue jetable de 5 ml.

- Purification de l'échantillon

0,5 ml de l'échantillon est placé dans le réservoir de la seringue de 5 ml puis drainé dans la première colonne ; 2 x 2 ml d'eau distillée sont ensuite placés dans la seringue de 5 ml puis passés dans l'ensemble des colonnes à un flux de 0,35 ml/minute. La colonne Dowex 50 est ensuite écartée. La seringue de 5 ml, après avoir été lavée, est placée sur la colonne Dowex 1 ; 2 x 2 ml d'eau distillée sont ensuite passés à travers la colonne Dowex 1 à un flux de 0,70 ml/minute.

L'éluat des acides organiques fixés sur cette colonne se fera avec 3 ml d'acide formique 14 N.

L'éluat récupéré dans un tube à hémolyse sera ensuite placé dans un dessiccateur sous vide en présence de pastilles de soude.

Après évaporation de l'acide formique, les acides organiques présents seront suspendus de nouveau dans 0,5 ml d'eau distillée.

- Analyse des échantillons

Les mesures ont été effectuées sur un chromatographe liquide haute pression Waters modèle 202 équipé d'un détecteur UV à longueur variable, fixé à 250 nm.

5 à 10 µl d'échantillon prélevé par un injecteur automatique Waters modèle U 6K ont été passés sur 2 colonnes C-18 10 µm (Waters) à compression radiale montées en série.

La phase mobile était constituée d'une solution de 0,01 M $K_2 HPO_4$ amenée à pH 2,5 par $H_2 PO_4$. Le débit était fixé à 3 ml/min., la pression à 4000 PSI.

C/ Chromatographie liquide basse pression- Purification de l'isocitrate déshydrogénase et de l'isocitrate lyase par chromatographie sur DEAE-Trisacryl M.

5 grammes de mycélium récupérés par filtration sous vide sont suspendus dans 20 ml de tampon phosphate 0,2 M pH 6,5 à 4°C contenant :

1 mM Mg Cl₂
0,1 mM dithiothréitol
0,1% sérum albumine.

Après broyage pendant 1 mn à l'ultrat turax, la suspension est centrifugée 20 mn à 20.000 g.

Le surnageant est récupéré et saturé à 60% par du sulfate d'ammonium. Pendant cette opération, le pH est maintenu à 6,5 par ajout d'une solution Tris 2M. La suspension est ensuite conservée 2 h à 4°C sous fréquente agitation. Le précipité obtenu est récupéré par centrifugation à 1500 g pendant 15'. Le culot est ensuite dissous dans un volume minimum de tampon Tris/acétate 50 mM pH 7,5 contenant :

1 mM Mg Cl₂
0,1 mM dithiothréitol
2 mM d'acide citrique
0,1% sérum albumine.

Cette solution est dialysée une nuit à +4°C contre le tampon Tris/acétate sans sérum albumine (tampon B). 1 ml du dialysat est ensuite chromatographié sur une colonne de DEAE Trisacryl M de 1,6 x 10 cm préalablement équilibrée par le tampon B.

Les protéines non retenues sont éluées par 250 ml de tampon B à un débit de 10 cm h⁻¹.

Les protéines retenues sont éluées par un gradient KCl 0 à 0,5 M dans le tampon B à un débit de 8 mM cm⁻¹ et 10 cm h⁻¹. Des fractions de 2,5 ml sont prélevées dans lesquelles les activités enzymatiques sont recherchées.

- Purification de la malate déshydrogénase par chromatographie sur Blue Sepharose CL-6B.

Dans un premier temps la malate déshydrogénase a été séparée sur DEAE-Trisacryl suivant le protocole cité plus haut à l'exception du tampon B qui dans ce cas ne contenait pas d'acide citrique. Toutes les fractions présentant une activité malate déshydrogénase ont ensuite été récupérées, mélangées, puis lyophilisées.

Le produit lyophilisé est dissous dans 1,5 ml de tampon Tris/HCl 15 mM pH 6,5 contenant :

5 mM Mg Cl₂

0,1 mM dithiothréitol.

La solution ainsi obtenue est dialysée une nuit à +4°C contre ce tampon.

Le dialysat est alors appliqué sur une colonne de Blue Sepharose CL-6B de 0,5 x 4 cm préalablement équilibrée par le tampon Tris. Les protéines non retenues sont éluées par 7 ml de tampon Tris. Ne disposant pas d'un appareil à gradient de taille suffisamment faible, nous avons élué les protéines retenues dans la colonne par passage successif de 2 ml d'une solution de NADH de concentration croissante, de 1 à 12 mM par paliers de 1 mM, dissous dans le tampon B, le drainage de la colonne s'effectuant à pression atmosphérique. Les activités malate déshydrogénase sont recherchées dans les fractions de 1 ml prélevées après chaque addition de NADH.

ANNEXE TECHNIQUE N° 3

EXTRACTION ET DOSAGE DES NUCLÉOTIDES PYRIMIDIQUES

Les coenzymes NAD^+ , NADP^+ et NADH , NADPH doivent obligatoirement, pour être stables, être extraits respectivement en milieux acide et basique. Dans ces conditions, SMITH (1981) montre que NAD^+ et NADP^+ sont stables dans HCl 0,05 N à 100°C , tandis que NADPH est stable dans KOH 100°C ; toutefois, dans ces conditions extrêmes, NADH est détruit d'environ 1% chaque minute.

MODE OPÉRATOIRE

Environ 3 g de mycélium seront récupérés par filtration et immédiatement lavés par 30 ml d'un mélange Méthanol/ H_2O 50/50 à -40°C , puis plongés dans l'azote liquide. Après lyophilisation, 2 x 50 mg de mycélium seront prélevés pour être traités suivant le protocole d'extraction de SAEZ et LAGUNAS (1976).

- Préparation de l'extrait acide

Les 50 mg de mycélium seront mélangés à 4 ml d' HCl 0,4 M et 0,4 ml de Tris 0,4 M dans un mortier préalablement refroidi à l'azote liquide. Le mélange est réduit en poudre en présence d'un excès d'azote liquide, le résultat de ce broyage sera ensuite transféré dans un tube 16/160 en pyrex, le tout placé sous agitation fréquente à -10°C pendant 30 mn. Ce procédé sera répété deux fois. L'extrait obtenu est ensuite centrifugé à 0°C pendant 10 mn à 10000 g ; le surnageant ajusté toujours à 0°C à pH 6,5 avec KOH 10 N. Après 15 minutes, le précipité de KClO_4 sera éliminé par centrifugation dans les mêmes conditions. Le surnageant sera alors utilisé pour la détermination des coenzymes oxydés.

- Préparation de l'extrait alcalin

Les 50 mg de mycélium seront mélangés à 5 ml de KOH 0,1 N dans un mortier préalablement refroidi à l'azote liquide. Le mélange, réduit en poudre en présence d'azote liquide, sera stocké sous agitation fréquente pendant 20 mn à -10°C , puis chauffé 1 mn à 90°C . Après refroidissement à 0°C , l'extrait sera neutralisé par KHCO_3 2M. Après centrifugation à 1000 g pendant 10 mn, le surnageant pourra être utilisé pour la détermination des coenzymes réduits.

Les concentrations en coenzymes seront déterminées par la méthode de BRODY (1970).

Dosage d'NAD

500 µl de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 8,8
 100 µl d'alcool éthylique 95 %
 10 à 50 µl d'extrait acide
 QSP 1,95 ml
 Mesurer la D.O. à 340 nm
 Ajouter 50 µl d'une dilution 1/100 d'alcool déshydrogénase
 Suivre la D.O. jusqu'au plateau

Dosage d'NADP⁺

1000 µl de tampon Tris/HCl 0,1 pH 7,5
 50 µl de glucose -6 -P (5 mg/ml)
 10 à 50 µl de l'extrait acide
 QSP 1,98
 Mesurer la D.O. à 340 nm
 Ajouter 20 µl d'une dilution 1/50 de glucose 6 P déshydrogénase
 Suivre la D.O. jusqu'au plateau

Dosage d'NADH

500 µl d' -cétoglutarate (32 mg/ml)
 1000 µl de pyruvate de sodium (50 mg/ml)
 200 µl de chlorure d'ammonium 1 M
 10 à 50 µl de l'extrait basique
 QSP 1,98
 Mesurer le D.O. à 340 nm
 Ajouter 20 µl d'une dilution 1/100 de lactate déshydrogénase
 Suivre la D.O. jusqu'au plateau

Dosage de l'NADPH

Après oxydation de l'NADH par la lactate déshydrogénase, ajouter 20 µl d'une dilution au 1/100 de glutamate déshydrogénase. Suivre à nouveau le D.O. à 340 nm jusqu'au plateau. Par différence avec l'extrait précédent déduire la concentration en NADPH.

REMARQUES

Les additions de concentrations connues des coenzymes avant le processus d'extraction ont montré que le non-respect des températures pouvait entraîner des erreurs importantes allant jusqu'à 37% pour l'extraction des coenzymes réduites. Dans de bonnes conditions d'extraction, nous avons obtenu des pourcentages de récupération allant de 83 % à 92 %.

ANNEXE TECHNIQUE N° 4

RECHERCHE ET DOSAGE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

A/ Dosage des activités enzymatiques extracellulaires- Dosage de l' α -amylase (EC 3.3.1.1.)

Le dosage de l'activité sur les filtrats de culture s'est effectué par une méthode automatique sur un appareil Technicon modèle auto-analyseur II. Le principe du dosage est de mesurer spectrocologiquement l'apparition des fonctions réductrices libérées par l'hydrolyse d'une solution d'amidon sous l'action de l'enzyme. Le composé subissant la réduction est dans ce cas le ferricyanure de potassium qui se décolore à 90°C en présence de groupements réducteurs. La correction des éventuels sucres réducteurs, présents dans les filtrats de culture avant action de l'enzyme, s'effectue en portant à ébullition pendant 1 minute l'échantillon à analyser. La lecture se fait à 440 nm et l'activité est exprimée en unité de pouvoir saccharifiant PS (50) par millilitre, par rapport à un témoin enzymatique de titre connu.

- Dosage de la B 1-3 Glucanase (EC 3.2.1.6.)

Le dosage de la B 1-3 glucanase s'effectue suivant le principe de REESE et MANDELS (1966). Un ml de substrat (laminarine utilisé à la concentration de 5 mg/ml⁻¹ dans un tampon citrate 0,05 M pH 4,5) est ajouté à 1 ml de solution enzymatique à dilution appropriée et placé à 50°C pendant une heure. Un ml de surnageant est ensuite placé dans un bain-marie porté à ébullition pendant 1 mn. Le glucose libéré est dosé par la méthode du DNS (annexe technique n° 7). Les résultats seront exprimés en μ M de glucose libéré par minute par millilitre.

- Dosage de la chitinase (EC 3.2.1.1.4.)

Une suspension de chitine est préalablement préparée de la manière suivante : 2,5 g de chitine broyée sont placés dans 50 ml d'H₃ PO₄ 85% sous agitation pendant 24 heures à 4°C ; la chitine est ensuite homogénéisée dans 500 ml d'eau distillée, récupérée par filtration, lavée abondamment. Après remise en suspension et neutralisation par NaOH 1 N, la chitine est de nouveau filtrée et séchée à 14°C.

La solution substrat est ensuite composée de 0,5 g de chitine pour 100 ml de tampon phosphate 0,05 M pH 6,6.

Un ml de cette solution est ajouté à 1 ml de solution enzymatique à la dilution appropriée, et placé à 50°C pendant 1 h. Un ml de surnageant est ensuite placé une minute dans un bain-marie porté à ébullition. Le N-acétyl-D-glucosamine libéré est dosé par la méthode au DNS (annexe technique n° 7).

Les résultats sont ensuite exprimés en équivalents glucose libérés par minute par millilitre.

B/ Recherche des activités enzymatiques *in vitro*

Un gramme de mycélium est récupéré par filtration puis lavé deux fois par 20 ml d'eau distillée à 0°C. Le mycélium est ensuite transféré dans 10 ml de tampon phosphate pH 6,5 0,2 M à 0°C, contenant :

5 mM MgCl₂
1 mM d'EDTA
0,5 mM de cystéine.

Le mélange est ensuite broyé à l'ultra-turrax en veillant à conserver la température sous les 5°C par un bain de glace. Le broyat ainsi obtenu est centrifugé 30 mn à 15000 g à 4°C ; le surnageant est récupéré et stocké à 4°C pour l'étude des activités enzymatiques. Les activités seront exprimées en nmoles substrats transformés par minute, par mg de protéines. Les protéines seront dosées suivant la technique énoncée dans l'annexe technique n° 7.

Les modes opératoires ont fait l'objet de recherches en vue de donner des activités optimales chez *A. oryzae* ; ils comporteront donc des variantes par rapport aux protocoles initiaux des auteurs.

1 - Glucose-6-P déshydrogénase (EC 1.1.1.49 - NG et DAWES, 1973)

0,5 ml tampon phosphate 0,2 M pH 6,5
0,1 ml NADP⁺ 0,005 M
0,1 ml MgCl₂ 0,05 M
0,1 ml glucose-6-P 0,05 M
0,05 à 0,15 ml d'extrait ϵ 6,22 10³
QSP 1 ml DO 340 nm

Blanc : remplacer 0,1 ml glucose-6-P par 0,1 ml d'eau distillée

2 - 6-P-Gluconate déshydrogénase

Idem que ci-dessus mais ajouter 0,1 ml 6-P-gluconate 0,05 M

3 - Aldolase (EC 1.2.1.12 - WOOD, 1971)

0,5 ml tampon phosphate 0,2 M pH 7,5

contenant :

1,4 x 10⁻³ M CoCl₂

2 x 10⁻⁴ M cystéine

0,1 ml fructose diphosphate de sodium 0,02 M

0,1 ml NADH 0,2 M

10 µl glycérophosphate déshydrogénase-triose phosphate
isomérase (BOEHRINGER)

0,05 à 0,15 ml d'extrait ε 6,22 10³

QSP 1 ml DO 340 nm

Blanc : remplacer 0,1 ml fructose diphosphate de sodium par
1 ml d'eau distillée

4 - Isocitrate déshydrogénase NADP⁺ dépendante (EC 1.1.1.42 - NG et
DAWES, 1973)

0,5 ml tampon phosphate pH 6,5 0,2 M

0,1 ml NADP⁺ 0,005 M

0,1 ml Mg Cl₂ 0,05 M

0,1 ml isocitrate 0,05 M

0,05 à 0,15 ml d'extrait ε 6,22 10³

QSP 1 ml DO 340 nm

Blanc : remplacer isocitrate par 0,1 ml d'eau distillée

5 - Isocitrate déshydrogénase NAD⁺ dépendante (EC 1.1.1.41 - NG et
DAWES, 1973)

0,5 ml tampon phosphate pH 6,5 0,2 M

0,1 ml NAD⁺ 0,01 M

0,05 ml K CN 0,02 M

0,05 ml Mg Cl₂ 0,1 M

0,1 ml isocitrate ε 6,22 10³

0,2 ml d'extrait DO 340 nm

Blanc : remplacer 0,1 ml isocitrate par 0,1 ml d'eau distillée

6 - Isocitrate lyase (EC 4.1.3.1 - POLAKIS et BARTLEY, 1965)

0,5 tampon phosphate pH 6,5 0,2 M

0,1 ml cystéine 0,02 M

0,1 ml Mg Cl₂ 0,05 M

0,1 ml isocitrate

0,05 à 0,1 ml d'extrait ε 1,7 10⁴

QSP 1 ml DO 324 nm

Blanc : remplacer 0,1 ml isocitrate par 0,1 ml d'eau distillée

7 - Malate synthase (EC 1.4.1.3 - DIXON et KORNBERG, 1969)

0,5 ml de tampon phosphate pH 7 0,2 M

0,05 ml d'acétyl coenzyme A 0,0005 M

0,05 ml Mg Cl₂ 0,1 M

0,1 ml glyoxalate 0,02 M

0,1 à 0,3 ml d'extrait ε 4,5 10³

QSP 1 ml DO 232

Blanc : remplacer 0,1 ml glyoxalate par 0,1 ml d'eau distillée

8 - Succinate déshydrogénase (EC 1.3.9.91 - WEEGER et coll., 1969)

0,5 ml tampon tris/HCl pH 7 0,2 M
 0,1 ml KCN 0,1 M
 0,1 ml diphénolindophénol 0,005 mM
 0,1 ml phénazine méthosulfate 0,02 mM
 0,05 ml de succinate 0,1 M
 0,05 à 0,15 ml d'extrait ϵ 1,61 10^3
 QSP 1 ml DO 600 nm

Blanc : remplacer 0,1 ml succinate par 0,1 ml d'eau distillée

9 - Fumarase (EC 4.2.1.2 - REEVES et coll., 1971)

0,5 tampon phosphate pH 6,5 0,2 M
 0,1 ml cystéine 0,02 M
 0,1 ml malate 0,2 M
 0,1 à 0,3 ml d'extrait ϵ 2,44 10^3
 QSP 1 ml DO 240 nm

Blanc : remplacer 0,1 ml de malate par 0,1 ml d'eau distillée

10 - Malate déshydrogénase (EC 1.1.1.37 - GOSLING et DUGGAN, 1971)

0,5 ml tampon phosphate pH 6,5 0,2 M
 0,1 ml NADH 0,005 M
 0,1 ml oxaloacétate 0,02 M
 0,1 ml d'extrait ϵ 6,22 10^3
 QSP 1 ml DO 240 nm

Blanc : remplacer 0,1 ml d'oxaloacétate par 0,1 ml d'eau distillée

11 - Glutamate déshydrogénase NADP dépendante (EC 1.4.1.4 - KINGHORN et PATEMAN, 1972)

0,5 ml tampon tris/HCl pH 7
 0,1 ml EDTA 0,01 M
 0,1 ml cystéine 0,02 M
 0,1 ml $\text{NH}_4 \text{Cl}$ 2 M
 0,05 ml NADPH 0,005 M
 0,1 ml α -cétoglutarate 0,05 M
 0,05 ml à 0,1 ml d'extrait ϵ 6,22 10^3
 QSP 1 ml DO 340 nm

Blanc : remplacer 0,1 ml d' α -cétoglutarate par 0,1 ml d'eau distillée

12 - Glutamate déshydrogénase NAD dépendante (EC 1.4.1.2 - KINGHORN et PATEMAN, 1972)

Idem sauf remplacer 0,05 ml NADPH par 0,05 ml NADH 0,005 M

13 - α -cétoglutarate déshydrogénase

a) Méthode colorimétrique (Von TIGERSTROM et CAMPBELL, 1966)

0,5 ml tampon phosphate pH 6,5 0,2 M
 0,05 ml thiamine pyrophosphate 0,02 M
 0,05 ml coenzyme A 0,001 M
 0,1 ml NAD^+ 0,005 M
 0,1 ml cystéine 0,02 M
 0,1 ml α -cétoglutarate 0,02 M ϵ 6,22 10^3
 0,1 ml d'extrait DO 340 nm

Blanc : remplacer 0,1 ml coenzyme A par 0,1 ml d'eau distillée

b) Méthode manométrique (REEVES et coll., 1971)

0,5 ml tampon phosphate pH 6 0,2 M
 0,1 ml thiamine pyrophosphate 0,04 M
 0,1 ml $K_3 Fe (CN)_6$ 0,25 M
 0,5 ml α -cétoglutarate 0,04 M
 0,5 ml d'extrait
 QSP 2 ml

Après équilibration sous azote à 37°, la réaction est initiée en mélangeant le substrat contenu dans le bain aux réactifs.

Suivre l'évolution du dégagement de CO_2

Une unité enzymatique est la quantité d'enzyme catalysant le dégagement de 1 μ mole de CO_2 par 30 minutes.

14 - Enzyme malique (EC 1.1.1.40 - ZINK, 1974)

0,5 ml tampon phosphate pH 6,5 0,2 M
 0,1 ml $NADP^+$ 0,005 M
 0,1 ml $Mg Cl_2$ 0,01 M
 0,1 ml malate 0,05 M
 0,1 à 0,2 ml d'extrait ϵ 6,22 10^3
 QSP 1 ml DO 340 nm

Blanc : remplacer 0,1 ml malate par 0,1 ml d'eau distillée

15 - Phosphénolpyruvate carboxykinase (EC 4.1.1.32 - FLAVELL et FINCHAM, 1968)

0,5 ml tampon Hepes pH 6,5 0,04 M pH 6,8
 0,05 $Mn Cl_2$ 0,3 M
 0,05 $Na HCO_3$ 0,5 M
 0,05 ml ADP 0,02 M
 0,1 NADH 0,05 M
 0,005 ml malate déshydrogénase 1/50
 0,1 ml phosphoénolpyruvate 0,05 M
 0,5 à 0,1 ml d'extrait ϵ 6,22 10^3
 QSP 1 ml DO 340 nm

Blanc : remplacer 0,1 phosphoénolpyruvate par 0,1 ml d'eau distillée

16 - NADH oxydase (EC 1.6.9.9 - DOWLER et coll., 1963)

0,5 ml tampon phosphate pH 6,5 0,2 M
 0,1 ml NADH 0,005 M
 0,1 ml à 0,3 ml d'extrait ϵ 6,22 10^3
 QSP 1 ml DO 340 nm

17 - NADH cytochrome c oxydoréductase (EC 1.6.2.1 - DOWLER et coll., 1963)

0,5 ml tampon phosphate pH 7,5 0,2 M
 0,1 ml oxyde de sodium 0,05 M
 0,1 ml cytochrome c 7 mg/ml
 0,1 ml NADH 0,002 M
 0,05 ml à 0,1 ml d'extrait ϵ 19,2 10^3
 QSP 1 ml DO 553 nm

Blanc : remplacer 0,1 ml NADH par 0,1 ml d'eau distillée

ANNEXE TECHNIQUE N° 5

ISOLEMENT DES MITOCHONDRIES

5 gr de mycélium sont récoltés par filtration sous vide et suspendus dans 40 ml d'un tampon 10 mM TES/NaOH pH 7,0, 1 mM EDTA, 0,35 M saccharose, à 4°C.

La suspension est broyée dans un Warring Blender pendant 3 x 1', la température ne devant pas dépasser 7°C (CRAMER et coll., 1983). Le broyat est ensuite traité suivant les indications de SCHWITZGUBEL et coll. (1981), toutes les opérations étant effectuées à +4°C.

Après une première filtration sur toile à bluter, la suspension mycélienne est centrifugée à 10.000 g pendant 10 mn. Le surnageant est récolté et centrifugé 5 mn à 40.000 g sur rotor SS34 (centrifugeuse Sorval RC 2-B).

Le culot mitochondrial est alors re-suspendu soigneusement dans un milieu de lavage composé de 0,35 M saccharose, 10 mM tampon TES pH 7. La suspension est à nouveau centrifugée 5 mn à 40.000 g.

Le culot mitochondrial est finalement suspendu dans le tampon de lavage pour être mélangé, à raison de 7 à 17 mg de protéine, dans 40 ml d'une solution composée de 30 ml de tampon de lavage et de 10% de Percoll, soit 25% $\frac{V}{V}$ de Percoll (densité 1,06 g ml⁻¹), 0,25 M saccharose et 7,5 mM tampon TES pH 7.

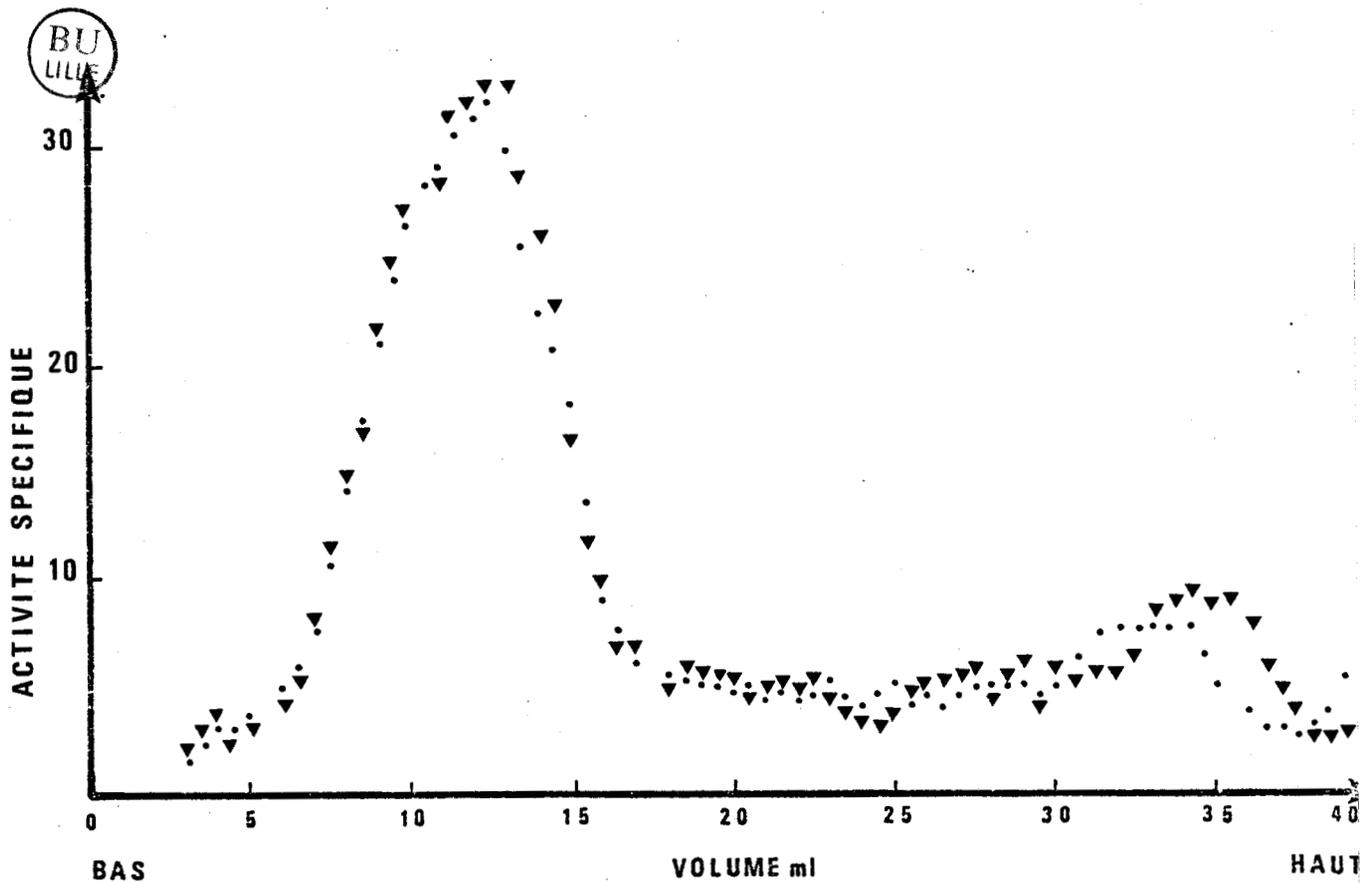
Après centrifugation, le gradient est collecté par fraction de 0,8 ml par pompage à partir du fond du tube. La distribution des mitochondries est alors évaluée par dosage de la succino-déshydrogénase suivant le protocole énoncé ci-dessous :

- Incuber la fraction à analyser 5mn à 20°C dans une solution composée de 0,35 M de saccharose, 1,7 mM Mg Cl₂, 17 mM ATP et 17 mM tampon phosphate pH 7,2 (tampon A). L'activité enzymatique est alors mesurée dans un milieu de réaction composé d'un tampon phosphate 30 mM pH 7,4, 0,1% sérum albumine bovine, 0,01%, Triton X100, 2 mM KCN, 0,1 mM EDTA 1,4 mM phénazine méthosulfate et 0,044 mM 2,6 -dichlorophé-nolindophénol. La réaction est initiée par addition de 10 mM succinate, la diminution de densité optique est alors mesurée à 600 nm (ϵ 21 10⁴).

Les fractions contenant les mitochondries (Fig. A1) sont collectées et, après dilution dans le tampon de lavage, centrifugées 20 mn à 48.000 g.

Le culot mitochondrial est alors repris par un faible volume de tampon de lavage et utilisé pour le dosage des activités enzymatiques après incubation 5 mn dans le tampon A.

Figure A1 : Distribution des mitochondries évaluée par dosage de la succino-déshydrogénase après un gradient de densité pratiqué sur Percoll. Les souches BrBv IV (▼) et 1135 (•) ont été cultivées 72 heures sur maltose.



ANNEXE TECHNIQUE N° 6

MESURE DES COEFFICIENTS RESPIRATOIRES

Les coefficients respiratoires ont été mesurés suivant la méthode décrite par UMBREIT et coll. (1957).

Une première fiole contenant en son centre 0,2 ml de KOH à 20% déposé sur un papier filtre permet la lecture de l'oxygène consommé, alors qu'une deuxième fiole sans KOH permet la lecture du gaz carbonique rejeté.

Les constantes des fioles sont données par l'équation :

$$k = V_g \frac{\frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_0}$$

- où V_g = Volume de la phase gazeuse dans la fiole
 V_f = Volume du liquide dans la fiole
 P_0 = Pression standard soit 10.000 mm en présence du liquide de Brodie
 T = Température en degrés absolus
 α = Solubilité du gaz dans la phase liquide à pression standard et à température T.

Température	α O ₂	α CO ₂
20°	0,0310	0,878
25°	0,0283	0,759
30°	0,0261	0,665
35°	0,0244	0,592

Méthode de calculs des échanges gazeux

Fiole avec KOH		Fiole sans KOH				Q R
h	$\mu\text{l O}_2$	h	$\frac{x_{\text{O}_2}}{k_{\text{O}_2}}$	Différence	$\mu\text{l CO}_2$	
Changement observé dans le manomètre, moins le changement observé dans le thermobaromètre (en mm)	h corrigée multipliée par la constante de la fiole rapportée à l'O ₂ (k_{O_2})	Changement observé dans le manomètre, moins le changement observé dans le thermobaromètre (en mm)	Quantité d'O ₂ consommée, rapportée à la fiole sans KOH, soit résultat colonne 3 divisé par le k_{CO_2} de cette fiole	Changement dans le manomètre dû au CO ₂ , soit résultat colonne 4 moins résultat colonne 3	h corrigée, multipliée par la constante de la fiole, rapportée au CO ₂ , soit résultat colonne 5 multiplié par k_{CO_2}	$\frac{\mu\text{l CO}_2}{\mu\text{l O}_2}$ soit résultat colonne 6 divisé par résultat colonne 2
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	
Exemple : - 28	$k_{\text{O}_2} = 0,96$ - 26,9	- 9,5	$k_{\text{O}_2} = 1,04$ - 25,8	+ 16,3	$k_{\text{CO}_2} = 1,25$ + 20,4	0,76



Pour les essais sur le mycélium, les QR ont été mesurés de façon suivante :

Contenu de la fiole : - 30 mg de mycélium (poids frais) prélevés après 17 h de culture sur le substrat étudié
- 2 ml de tampon phosphate pH 6,5 0,2 M

Contenu de l'anse : - 0,5 ml de substrat 10 g/l.

Après équilibrage de la température à 30°C le substrat est ajouté dans les fioles, sauf dans une utilisée pour la lecture de la respiration endogène. Après 45 mn, les concentrations résiduelles de substrat sont dosées. A partir des échanges gazeux défalqués de la respiration endogène, les QR ont été calculés pour les deux souches par rapport à une assimilation de substrat équivalente.

Pour les essais sur les protoplastes, un protocole similaire a été suivi :

Contenu de la fiole : - 4 x 10⁶ protoplastes/ml
- 2 ml tampon phosphate pH 6,5 0,2 M - 1,2 M KCl

Contenu de l'anse : - 0,5 ml de substrat 5 g/l.

ANNEXE TECHNIQUE N° 7

DOSAGES DE COMPOSES PAR VOIE CHIMIQUE

A/ Dosage des protéines par la méthode de LOWRY et coll. (1951)- Réactifs

1 - réactif Folin et Ciocalteu (MERK) dilué de moitié

2 - Mélange

- CuSO_4 à 1% dans H_2O 1 ml
- tartrate de sodium et de potassium 1 ml
- Na_2CO_3 à 2% dans NaOH 0,1 N q.s.p. 1000 ml

- Protocole expérimental

1 ml de solution à doser

3 ml du réactif 2.

Attendre 10 mn.

D. O. 500 nm

Ajouter 0,3 ml du réactif 1.

Attendre 30 mn.

Gamme étalon de sérum albumine bovine 0 à 80 $\mu\text{g/ml}$

B/ Dosage des sucres réducteurs par le réactif à l'acide dinitrosalicylique
(SUMMER, 1924)- Réactifs

1 - Dissoudre 5 g d'acide dinitrosalicylique dans 100 ml de NaOH 2 N

2 - Dissoudre 150 g de tartrate double de sodium et de potassium dans 250 ml d'eau distillée

3 - Mélanger les deux solutions sous agitation constante et porter à 500 ml avec de l'eau distillée

- Protocole expérimental

1 ml de solution à doser

1 ml de réactif

D.O. 540 nm

Porter le mélange à 100°C pendant 5' (bain-marie)

Refroidir sous eau froide

Diluer avec 25 ml d'eau distillée.

Gamme étalon de sucre réducteur de 0 à 400 $\mu\text{g/ml}$

C/ Caractérisation de l'acide kojique par le réactif au Fe Cl₃
(IKEDA et coll., 1957)

- Réactifs

Solution de Fe Cl₃ à 0,5 dans l'eau distillée

Solution de H Cl à 15%.

- Protocole expérimental

1 ml de solution à doser

1 ml de Fe Cl₃ à 0,5%

1 ml de H Cl à 15%

Comparer la coloration obtenue avec un standard d'acide

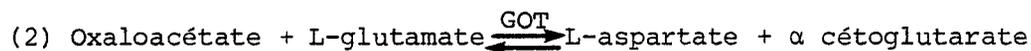
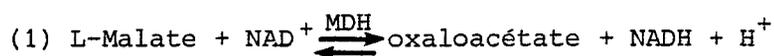
kojique dont la couleur en présence des réactifs est pourpre.

ANNEXE TECHNIQUE N° 8

DOSAGES DE COMPOSÉS PAR VOIE ENZYMATIQUE

A/ Dosage de l'acide malique

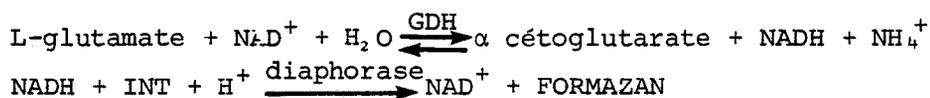
Pour doser ce composé dans les filtrats de culture nous avons fait appel au kit L-Malic acid de chez Boehringer basé sur la réaction :



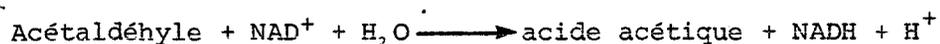
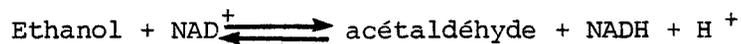
Ces réactions illustrent bien les propos de la page où nous avons abordé l'équilibre de la réaction 1. Un déplacement de cet équilibre vers l'oxaloacétate requiert nécessairement le couplage d'une seconde réaction métabolisant l'oxaloacétate.

B/ Dosage de l'acide glutamique

Ce composé a été dosé dans les filtrats de culture par le kit L-glutamic acid de chez Boehringer basé sur la réaction :

C/ Dosage de l'éthanol

Là encore ce composé a été dosé par un kit Boehringer basé sur la réaction :



D/ Dosage du glucose

Ce composé a été dosé selon la technique de SANTAMARIA et coll (1978).

Réactif

Dans 100 ml de tampon phosphate 0,05 M pH 6,5

0,0004 M Mg cl₂ dissoudre :

10 mg O-dianisidine

540 unités de glucose oxydase (de chez Boehringer grade I)

300 unités de peroxidase (de chez Boehringer grade I)

Protocole expérimental :

1 ml de réactifs D.O 425 nm

0,2 ml d'échantillons

1 heure à 37°C

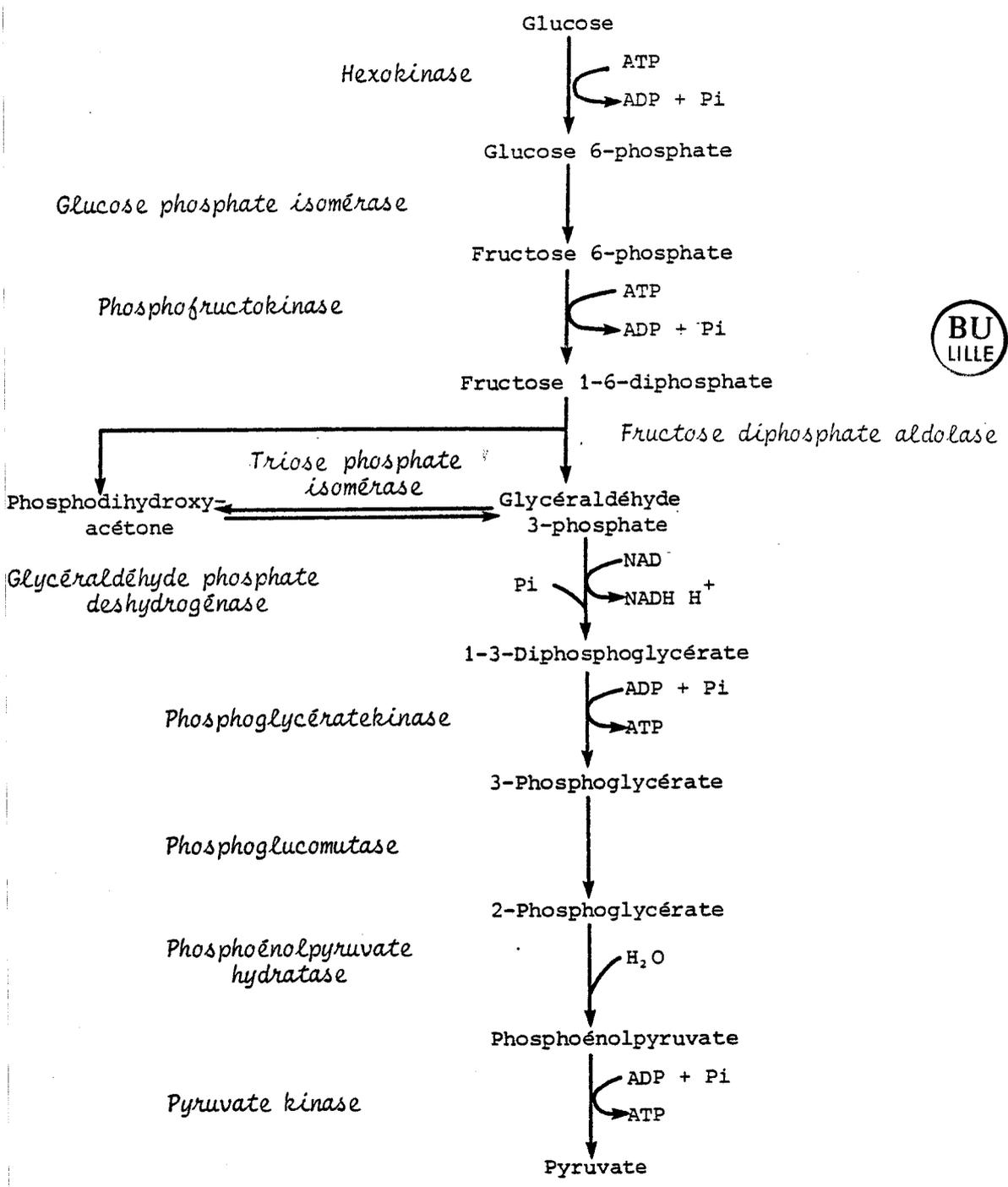
B I B L I O G R A P H I E
T E C H N I Q U E

- BRODY S., 1970.- Correlation between reduced nicotinamide adenine dinucléotide phosphate levels and morphological changes in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol* 101 (3) : 802-807.
- CRAMER C.L., J.L. RISTOW, T.J. PAULUS et R.H. DAVIS., 1983.- Methods for mycelial breakage and isolation of mitochondria and vacuoles of *Neurospora*. *Analytical Biochem.* 128 : 384-392.
- DIXON G.H. et H.L. KORNBERG., 1959.- Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochemical J.* 72, 3p.
- DOWLER W.M., P.D. SHAW et D. GOTTLIER., 1963.- Terminal oxidation in cell-free extracts of fungi. *J. Bacteriol* 86 : 9 - 17.
- FLAVELL R.B. et J.R.S. FINCHAM., 1968.- Acetate-non utilizing mutants of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol* 95 (3) : 1063-1068.
- GOSLING J.P. et P.F. DUGGAN., 1971.- Activities of tricarboxylic acid cycle enzymes, glyoxylate cycle enzymes, and fructose diphosphatase in bakers 'yeast during adaptation to acetate oxidation. *J. Bacteriol* 106 (3) : 908-914.
- IKEDA Y., K. NAKAMURA, K. UCHIDA et C. ISHITANI., 1957.- Two attempts upon improving an industrial strain of *Aspergillus oryzae* through somatic recombination and polyploidization. *J. Gen. Appl. Microbiol* 3 (2) : 93-101.

- KINGHORN J.R. et J.A. PATEMAN., 1973.- NAD and NADP L-glutamate deshydrogenase activity and ammonium regulation in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol* 78 : 39-46.
- LOWRY O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL., 1951.- Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- MALLARD P., 1981.- Contribution à l'étude de la production d' α amylase par *Aspergillus oryzae*. (Alb.) cohn. *Thèse de troisième cycle*. 133p.
- MILLER P.M., 1956.- Spectrographie analyse of water agar, potato dextrose agar and V8 juice agar. *Phytopath* 46 : 526.
- NG F.M.W. et E.A. DAWES., 1973.- Chemostat studies on the regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* by citrate. *Biochemical J.* 132 : 129-140.
- POLAKIS E.S. et W. BARTLEY., 1965.- Change in the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources. *Biochem. J.* 97 : 284-296.
- RANDERATH K., 1971.- Chromatographie sur couches minces. *Edité par Gauthier-Villars* 366-367.
- REESE E.T. et M. MANDELS., 1966.- β -glucanase other than cellulase *Methods Enzymol* 8 : 607-615.
- REEVES H.C., R. RABIN, W.S. WEGENER et S.J. AJL., 1971.- Assays of enzymes the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles. *Methods in microbiology* 6 A : 452-462. Edit. par J.R. Norris et D.W. Ribbons. London : Academic Press.
- SAEZ M.J. et R. LAGUNAS., 1976.- Determination of intermediary metabolites in yeast, critical examination of the effect of sampling conditions and recommendations for obtaining true levels. *Molecular et cellular Biochem.* 13 (2) : 73-78.
- SANTAMARIA F., F. REYES et R. LAHOZ., 1978.- Extracellular glucan containing (1 \rightarrow 3)- β and (1 \rightarrow 6)- β linkages isolated from *Monilinia fructigena*. *J. Gen. Microbiol* 109 : 287-293.
- SCHMIT J.C., 1981.- Rapid changes in pyridine nucleotide content of germinating *Neurospora crassa* conidia. *Experimental Mycology* 5 : 330-338.
- SCHWITZGUEBEL J.P. ; I.M. MOLLER et J.M. PALMER, 1981.- Change in density of mitochondria and glyoxysomes from *Neurospora crassa* : a re-evaluation utilizing silica sol gradient centrifugation. *J. Gen. Microbiol.* 126 : 289-295.
- STUMPF D.K. et R.H. BURRIS, 1979.- A micromethod for the purification and quantification of organic acid of the tricarboxylic acid cycle in plant tissues. *Analytical Biochem.* 95, 311-315.
- SUMMER J.B., 1924.- The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicylic acid. *J. of Biological Chemistry* 57 (2), 287-290.

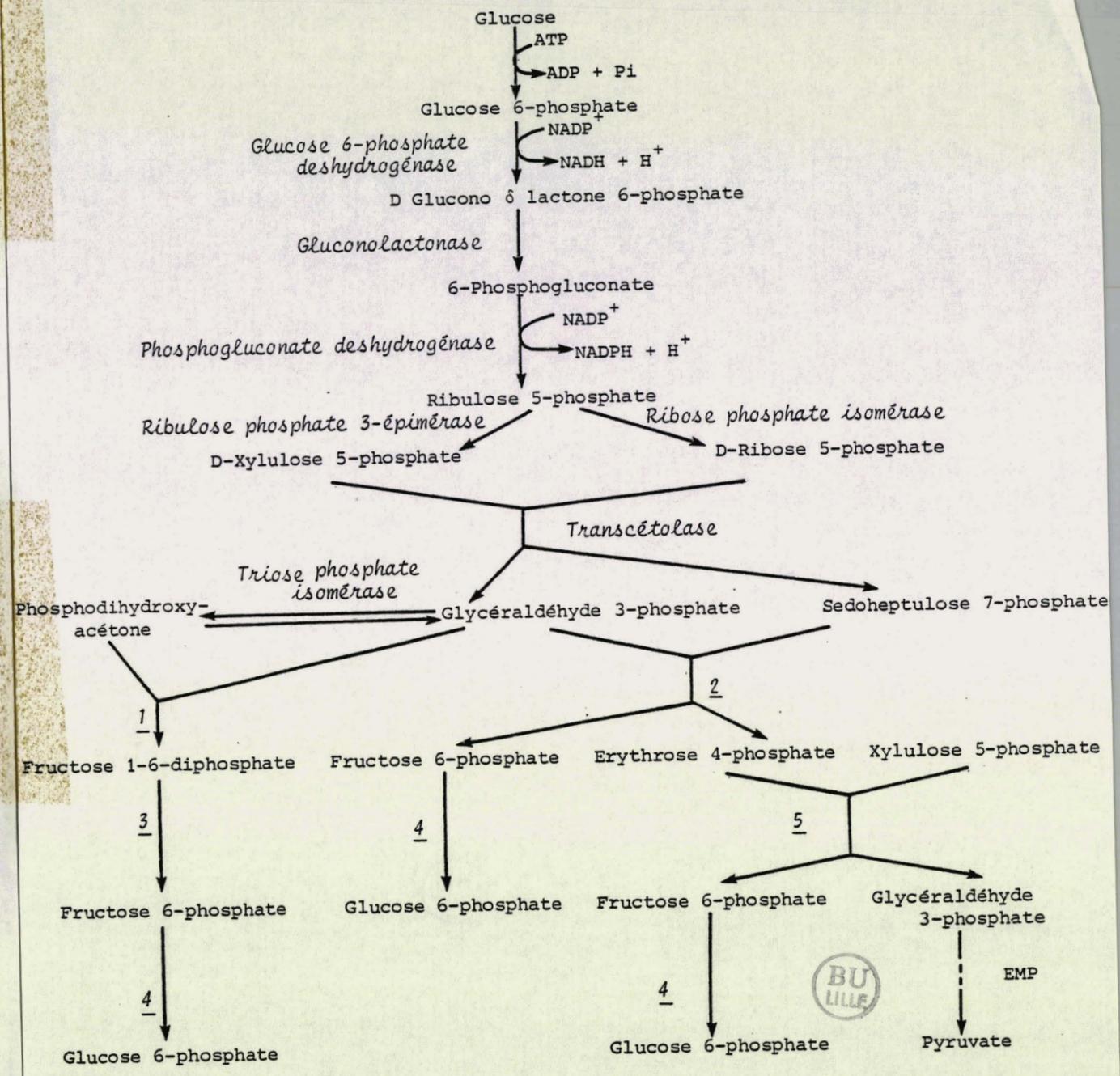
- UMBREIT W.W., R.H. BURRIS et J.F. STAUFFER, 1957.- Manometric techniques. *Burgess Publishing Co., Minneapolis.*
- VON TIGERSTROM M. et J.J.R. CAMPBELL, 1966.- The accumulation of α -ketoglutarate by suspensions of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 12 : 1105-1013.
- WEEGER C., D.V. DER VARTANIAN et W.P. ZEYLEMAKER., 1969.- Succinate deshydrogenase . *Methods in Enzymology* 13 : 81-90.
- WOOD W.A.- Assay of enzymes representation of metabolic patnays. *Methods in microbiology* : 6 A : 411-424. Edité par J.R. NORRIS et D.W. RIBBENS. London : Academic Press.
- YABUKI M., N. ONO, K. HOSHINO et S. FUKUI, 1977.- Rapid induction of α -amylase by non-growing mycelia of *Aspergillus oryzae*. *Appl. environment. Microbiol.* 34 (1) : 1-6.
- ZINK M.W., 1974.- Mechanism of regulation of the malic enzyme from *Fusarium*. *Can. J. Microbiol.* 20 : 443-454.

SCHEMA DES VOIES METABOLIQUES



• Métabolisme du glucose par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)

- 1 - Fructose 1-6-diphosphate aldolase
- 2 - Transaldolase
- 3 - Hexose diphosphatase
- 4 - Glucose phosphate isomérase
- 5 - Transcétolase



Métabolisme du glucose par la voie des hexoses monophosphates (HMP)

1-2-3-4-5 Enzymes (voir nomenclature page ci-contre).

1. Pyruvate kinase
2. Pyruvate déshydrogénase
3. Citrate synthétase
4. Aconitase
5. Isocitrate déshydrogénase
6. Glutamate déshydrogénase NADP^+ dépendante
7. Glutamate déshydrogénase NAD^+ dépendante
8. α cétooglutarate déshydrogénase
9. Succino-déshydrogénase
10. Fumarase
11. Malate déshydrogénase
12. Isocitratase
13. Malate synthétase
14. Phosphoénolpyruvate carboxykinase
15. Pyruvate carboxylase

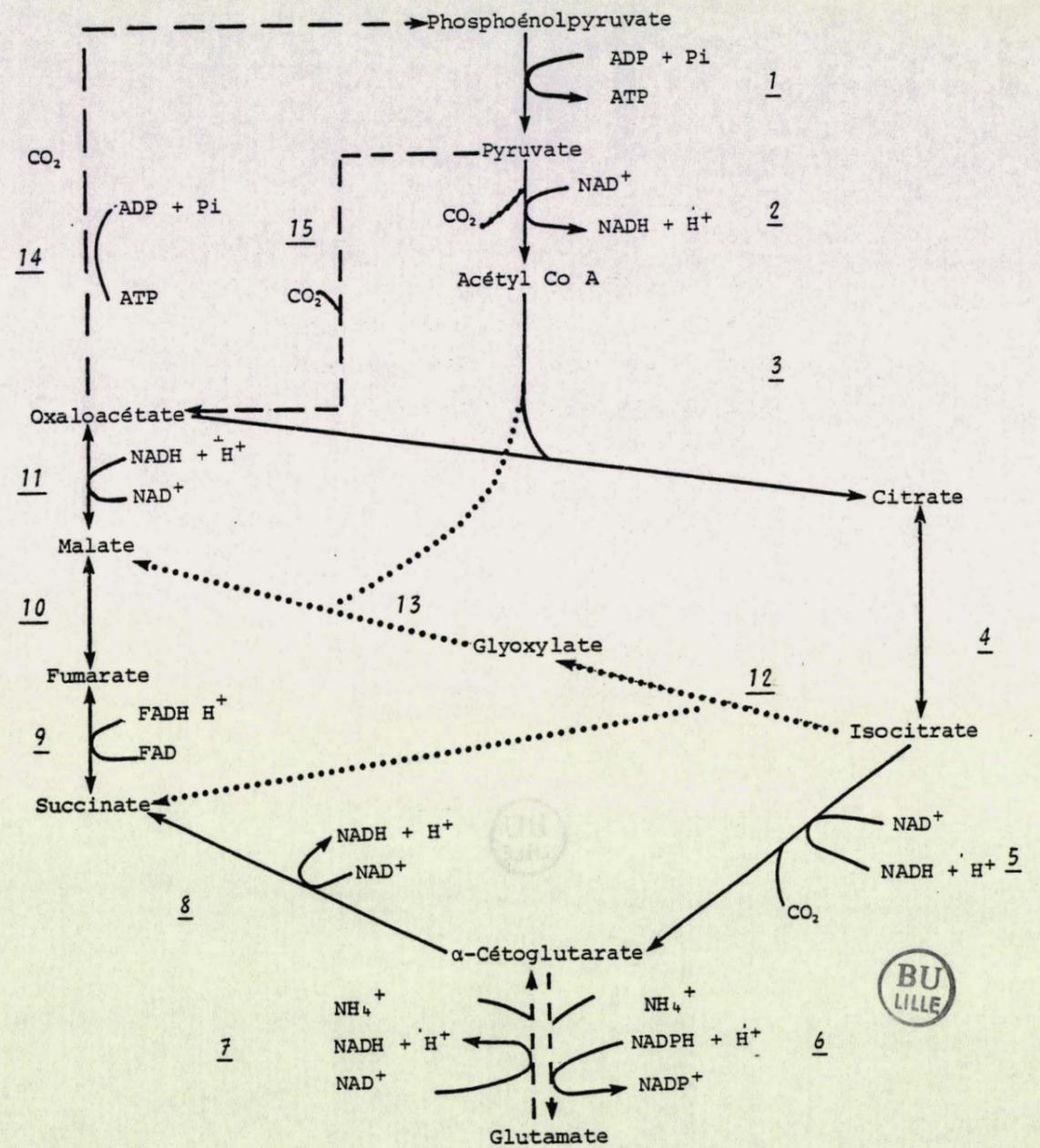


Schéma du cycle de Krebs ———, du cycle glyoxylique et des voies annexes ———.

Nomenclature des enzymes voir page ci-contre

Titre : métabolisme intermédiaire d' Aspergillus oryzae : étude de sa régulation et de ses rapports avec la production d' α -amylase.

En confiant ce travail au laboratoire de Cryptogamie de l'Université de Lille I, la Société Gist Brocades (ex. Rapidase) désirait établir les rapports liant le métabolisme intermédiaire à la production d' α -amylase chez une souche d'Aspergillus oryzae. Celle-ci acidifiant ponctuellement le milieu de culture aux dépens de la production d' α -amylase, le but de ce travail était de définir les facteurs à l'origine de cette acidification et de déterminer les méthodes pour éviter un tel phénomène.

Après avoir identifié l'acide malique comme principal responsable de cette acidification les recherches furent centrées sur l'étude du métabolisme intermédiaire, afin de déterminer la séquence enzymatique à l'origine de ce phénomène et en étudier la régulation. A partir de ces résultats et de nos travaux entrepris sur la biosynthèse de l' α -amylase les mécanismes répondant de cette accumulation et de la faible production d'enzyme furent définis. Ce qui a permis d'envisager un procédé d'optimisation de la production d' α -amylase pour cette souche.

