

N° d'identification :

CONFIDENTIEL = 2ans
ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II

--- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC ---

THESE

présentée à l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

SPECIALITE : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

Formation Doctorale : Sciences des Aliments

Ecole Doctorale : Biologie des Systèmes Intégrés. Agronomie. Environnement.

DEGRADATION DE LA CAFEINE PAR *Aspergillus* sp. ET *Penicillium* sp.

ETUDE PHYSIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE

par

DENIS Sylvain

Ingénieur UTC en Génie Biologique

Fonds Documentaire ORSTOM



010015250

Soutenue le 02 Avril 1996

devant le Jury composé de :

Mr. BENSOUSSAN Maurice

Maître de Conférences, ENSBANA, Dijon

Rapporteur

Mme COCHET Nelly

Maître de Conférences, UTC, Compiègne

Rapporteur

Mr. CROUZET Jean

Professeur, Université de Montpellier II

Président

Mr. MARIN Bernard

Directeur de Recherche, ORSTOM, Montpellier

Examineur

Mr. NAVARRO Jean-Marie

Professeur, Université de Montpellier II

Examineur

Mr. ROUSSOS Sévastianos

Directeur de Recherche, ORSTOM, Montpellier

Directeur de Thèse

N° d'identification :

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II

--- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC ---

THESE

présentée à l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

SPECIALITE : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

Formation Doctorale : Sciences des Aliments

Ecole Doctorale : Biologie des Systèmes Intégrés. Agronomie. Environnement.

DEGRADATION DE LA CAFEINE PAR *Aspergillus* sp. ET *Penicillium* sp.

ETUDE PHYSIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE

par

DENIS Sylvain

Ingénieur UTC en Génie Biologique

Fonds Documentaire ORSTOM
Cote : *Ax 15250* Ex :

Soutenue le 02 Avril 1996

devant le Jury composé de :

Mr. BENSOUSSAN Maurice	Maître de Conférences, ENSBANA, Dijon	Rapporteur
Mme COCHET Nelly	Maître de Conférences, UTC, Compiègne	Rapporteur
Mr. CROUZET Jean	Professeur, Université de Montpellier II	Président
Mr. MARIN Bernard	Directeur de Recherche, ORSTOM, Montpellier	Examinateur
Mr. NAVARRO Jean-Marie	Professeur, Université de Montpellier II	Examinateur
Mr. ROUSSOS Sévastianos	Directeur de Recherche, ORSTOM, Montpellier	Directeur de Thèse

*A mes Mayrig,
et à tous les Arméniens*

*A mon Père,
et aux hommes de bonne volonté*

A ma chère famille et à tous mes amis

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Biotechnologie du Centre ORSTOM de Montpellier, sous la direction scientifique de Monsieur Sévastianos ROUSSOS, Directeur de Recherche à l'ORSTOM. Je tiens tout particulièrement à le remercier pour m'avoir offert son soutien quotidien et surtout pour m'avoir transmis sa passion des Champignons Filamenteux.

Je tiens en premier lieu à exprimer toute ma gratitude à Monsieur Jean CROUZET, Professeur à l'Université de Montpellier II et responsable de la Formation Doctorale "Sciences des Aliments", pour avoir accepté la Présidence de ce Jury de thèse.

C'est avec un plaisir non dissimulé que je remercie Madame Nelly COCHET, Maître de Conférences à l'Université de Technologie de Compiègne, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Je profiterai de cette occasion pour lui dire combien j'ai pu apprécier mon séjour à l'UTC, dont la qualité et la diversité des enseignements m'auront beaucoup enrichi.

Que Monsieur Maurice BENSOUSSAN, Maître de Conférences à l'ENSBANA, qui me fait le grand honneur d'évaluer ce travail, reçoive ici toute ma profonde reconnaissance.

Toute ma reconnaissance va également à Monsieur Jean-Marie NAVARRO, Professeur à l'Université de Montpellier II, pour avoir accepté de participer à ce jury.

Enfin, je tiens à remercier Monsieur Bernard MARIN, Directeur de Recherche à l'ORSTOM, pour avoir accepté d'examiner ce travail, et d'avoir bien voulu me consacrer un peu de son temps et de son énergie durant ces trois dernières années.

Je ne remercierai jamais assez Christophe BRUSSET, Maria SAUVAGE, Franck LENHARDT et Sandrine CHAUVEAU pour m'avoir épaulé dans la réalisation de ce travail. Qu'ils sachent ici que leurs travaux et leur présence m'auront beaucoup apporté.

Toute ma gratitude et toute mon amitié sincère vont à Isabelle PERRAUD-GAIME, Eric GIRAUD et Nathalie PUJET pour m'avoir aidé dans la rédaction et la réalisation de ce mémoire, mais surtout pour tous les bons moments passés ensemble depuis quatre ans, devant un "Puissance 4" en 3D, face à un mur de squash, ou au milieu d'une rivière...

Mon attention toute particulière va à Monsieur Christopher AUGUR ainsi qu'à tous les membres du département de Biotechnologie de la UAM pour m'avoir accueilli à Mexico pendant 3 mois et demi. Sachez que ce séjour restera pour moi une expérience inoubliable.

Je tiens également à exprimer toute ma sympathie à tous les autres membres du laboratoire de Biotechnologie, anciens ou récents, Laure HANNIBAL, Estelle BRESSON, Jean-Pierre GUYOT, Juliette MORLON-GUYOT, Eliane PERRAUD, avec qui j'ai souvent partagé des moments inoubliables et qui m'ont toujours encouragé. Je ne manquerai pas non plus de remercier Monsieur Maurice RAIMBAULT, qui même depuis la Colombie, a prêté beaucoup d'intérêt à ce travail.

Un grand merci aussi à tous les étudiants, thésards et autres stagiaires qui ont su maintenir, parfois à leur dépourvu, l'ambiance chaleureuse et vivante qui a souvent régné dans ce laboratoire. Mes amitiés en particulier à Gerardo, Maria, Laurent, Valérie, Sandrine, Alain, Sébastien, Bloc-Bloc, Sylvie, Catie (Miss Gibolin), Manu, Agathe, Vincent, Sylvie, Fanny, et une attention toute particulière pour Wāfaa, Valérie, Alvaro, Jesus et Mehdi, avec mon "bon courage".

Enfin, je n'oublierai pas de citer tous mes amis montpelliérains et en particulier ceux avec qui j'ai partagé ma passion pour le chant chorale et la musique, bien que ma culture dans ce domaine soit loin d'égaliser la votre ! Merci à Bib, Magou, Eric, Anne, Jean-Michel, Anne, Bernard, Sandrine, Hélène, Karine, Marie, Virginie, Sylvaine, Hélène, Philippe, et tous les autres...

RESUME

Ce travail a été axé sur la compréhension des mécanismes physiologiques et biochimiques de la dégradation de la caféine (ou 1,3,7-triméthylxanthine) par deux champignons filamenteux cultivés en milieu liquide synthétique à base de caféine et de saccharose. Les deux souches retenues pour cette étude appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*.

Deux méthodes chromatographiques (CLHP et CCM) ont été optimisées pour la détermination qualitative et quantitative de la caféine et de toutes les méthylxanthines susceptibles d'être produites par réaction de *N*-déméthylation de cet alcaloïde.

Une étude physiologique a permis d'établir les principaux paramètres environnementaux et nutritionnels conduisant à une utilisation optimale de la caféine par les deux champignons filamenteux étudiés (*Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25). Parmi ces paramètres, les plus influents sont la concentration initiale en caféine, la température d'incubation, l'addition d'oligoéléments et l'addition d'ions ammonium au milieu de culture. Ces derniers présentent un fort pouvoir inhibiteur sur la dégradation de la caféine quelque soit la souche fongique considérée (mécanisme de répression). La caféine peut être utilisée par les deux microorganismes comme unique source d'azote. Enfin, *Penicillium* V33A25 est particulièrement tolérant aux concentrations élevées en caféine.

La voie métabolique de la dégradation de la caféine est identique chez les deux souches. Les premières étapes de cette voie correspondent à des *N*-déméthylations successives de l'alcaloïde conduisant principalement à la formation de théophylline puis de 3-méthylxanthine. Ce résultat marque une nette différence avec les voies de dégradation de la caféine établies pour certaines bactéries ou dans les cellules hépatiques.

Cette différence se retrouve également au niveau des caractéristiques biochimiques de l'activité caféine déméthylase, décrites pour la première fois chez un champignon filamenteux au cours de ce travail. Ainsi, contrairement aux activités déméthylasiques étudiées dans divers systèmes eucaryotes, l'activité caféine déméthylase d'*Aspergillus* V12A25 est cytoplasmique, et non liée à une structure membranaire de type microsomale. Par ailleurs, bien que le NADPH présente un fort effet activateur sur l'activité caféine déméthylase d'un extrait intracellulaire brut, les premiers essais de fractionnement des protéines a démontré que la réaction enzymatique est dépendante d'un autre cofacteur, différent de l'oxygène. Ce phénomène n'a jamais été rapporté pour d'autres systèmes enzymatiques impliqués dans la dégradation de la caféine.

Ces principaux résultats soulignent l'originalité de ces recherches et l'intérêt de poursuivre la purification et la caractérisation des "décaféinases" produites par des champignons filamenteux.

ABSTRACT

Caffeine degradation by *Aspergillus* and *Penicillium* strains. Physiological and biochemical study.

The purpose of this work was to investigate the physiological and biochemical mechanisms of the degradation of caffeine by two filamentous fungi strains: *Aspergillus* V12A25 and *Penicillium* V33A25. Two chromatographic methods were optimized for the determination of all methylxanthines. We studied the effects of different environmental and nutritional parameters on caffeine degradation by these microorganisms, cultivated in synthetic liquid media. The more influent parameters are the initial caffeine concentration, the incubation temperature, the supplementation of trace elements, and the addition of ammonium ions. The fungi are able to grow on caffeine as the sole source of nitrogen, but not as the sole source of carbon and nitrogen. The *Penicillium* strain is particularly tolerant to high caffeine concentrations and still grows in liquid medium containing 2% caffeine. Finally, we showed that ammonium ions have a repressive effect on the biosynthesis of decaffeines. Metabolic pathways of caffeine in *Aspergillus* V12A25 and *Penicillium* V33A25 are identical. First principal transformation products formed by successive *N*-demethylations of caffeine, were identified as theophylline and 3-methylxanthine. A preliminary characterization of the caffeine demethylase activity of *Aspergillus* V12A25 was done. This inducible activity is cytoplasmic, stimulated by NADPH (but it is dependant of an unknown cofactor), and is relatively unstable.

SOMMAIRE

	pages
REMERCIEMENTS	i
RESUME	iii
ABSTRACT	iv
SOMMAIRE	v
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xiii
ABREVIATIONS ET GLOSSAIRE	xv
 1. INTRODUCTION GENERALE	 1
 2. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	 4
2.1. La caféine	4
2.1.1. Origine de la caféine et ses différentes sources	4
2.1.2. Chimie de la caféine	6
2.1.2.1. Généralités	6
2.1.2.2. Méthodes de décaféination	8
2.1.3. Méthodes d'analyse de la caféine	9
2.1.4. Effets biologiques de la caféine	12
2.1.4.1. Rôle chez le caféier	12
2.1.4.2. Effets chez l'homme	12
2.1.4.3. Effets inhibiteurs et mutagènes	14
2.1.5. Applications de la caféine	15
2.1.5.1. Applications thérapeutiques	15
2.1.5.2. Autres applications	16
2.2. Métabolisme de la caféine	17
2.2.1. Biosynthèse de la caféine	17
2.2.2. Biodégradation de la caféine	19
2.2.2.1. Chez l'homme	19
2.2.2.2. Chez <i>Coffea arabica</i>	21
2.2.2.3. Chez les bactéries	22
2.2.2.4. Chez les champignons filamenteux	25

2.3. Les champignons filamenteux	26
2.3.1. Généralités	27
2.3.2. Les genres <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>	28
2.3.2.1. Classification	28
2.3.2.2. Caractéristiques morphologiques	29
2.3.2.3. Utilisation en biotechnologie	30
2.3.3. <i>Aspergillus</i> V12A25 et <i>Penicillium</i> V33A25	31
2.3.3.1. Origine des souches	31
2.3.3.2. Caractéristiques des souches	32
2.4. Conclusion	34
3. MATERIEL ET METHODES	36
3.1. Microorganismes	36
3.2. Milieux de culture	36
3.2.1. Pour l'étude morphologique	36
3.2.2. Pour la conservation et la production de conidies	37
3.2.3. Pour la culture en fioles d'Erlenmeyer	37
3.2.3.1. Milieu de base Caféine-Saccharose (CS)	37
3.2.3.2. Autres milieux	37
3.3. Conditions de culture	39
3.3.1. Préculture et préparation d'une suspension de conidies	39
3.3.2. Etude morphologique sur milieux gélosés	39
3.3.2.1. Milieux d'identification	39
3.3.2.2. Etude de la croissance apicale	39
3.3.2.3. Etude de l'indice de sporulation	39
3.3.3. Cultures en milieux liquides agités	39
3.3.4. Méthodologie des prélèvements	41
3.4. Caractéristiques morphologiques - Identification des souches	41
3.4.1. Description des colonies sur milieux d'identification	41
3.4.1.1. Etude macroscopique	41
3.4.1.2. Etude microscopique	41
3.4.1.3. Clés d'identification	41
3.4.2. Mesure de la croissance apicale	42
3.4.3. Mesure de l'indice de sporulation	42
3.5. Estimation de la biomasse et analyses physico-chimiques	42
3.5.1. Estimation de la biomasse	42
3.5.2. Dosage des sucres	42
3.5.3. Dosage des protéines	42
3.5.4. Dosage de l'urée et du sulfate d'ammonium	43
3.5.5. Mesure du pH	43

3.6. Analyse de la caféine et des méthylxanthines	43
3.6.1. Traitement des échantillons	43
3.6.1.1. Pour l'analyse quantitative par CLHP	43
3.6.1.2. Pour l'analyse qualitative par CCM ou par CLHP	43
3.6.2. Analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	44
3.6.2.1. Matériel	44
3.6.2.2. Conditions opératoires standards	44
3.6.3. Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)	44
3.6.3.1. Matériel	44
3.6.3.2. Conditions opératoires standards	45
3.7. Etude de l'activité déméthylasique chez <i>Aspergillus</i> V12A25	45
3.7.1. Obtention d'un extrait intracellulaire brut	45
3.7.2. Mise en oeuvre des essais enzymatiques	46
3.8. Techniques de purification des déméthylases	47
3.8.1. Techniques de dessalage/concentration	47
3.8.1.1. Dialyse	47
3.8.1.2. Ultrafiltration	47
3.8.1.3. Colonne de dessalage "PD-10"	47
3.8.2. Précipitation au sulfate d'ammonium	48
3.8.3. Système automatisé de purification des protéines	48
3.8.3.1. Matériel	48
3.8.3.2. Conditions opératoires	48
3.9. Planification expérimentale	48
3.10. Expression des résultats	49
3.10.1. Calcul des distances de migration (Rf)	49
3.10.2. Croissance mycélienne et vitesses de dégradation de la caféine	50
3.10.3. Calcul de l'activité déméthylasique	50
 4. METHODES D'ANALYSE DES METHYLYXANTHINES	 52
4.1. Optimisation du solvant d'extraction des méthylxanthines	52
4.1.1. Extraction de la caféine et d'un étalon interne	52
4.1.2. Extraction des méthylxanthines	54
4.2. Mise au point de la méthode par chromatographie sur couche mince	55
4.2.1. Phase stationnaire et support	55
4.2.2. Choix du solvant de migration	55
4.2.2.1. Essais préliminaires	55
4.2.2.2. Essais complémentaires	56
4.2.3. Seuil de visualisation des méthylxanthines	58
4.3. Méthode par chromatographie liquide haute performance	59
4.3.1. Méthode préliminaire	59
4.3.2. Amélioration de la méthode	59
4.4. Conclusion	62

5. CARACTERISATION ET IDENTIFICATION DES SOUCHES	64
5.1. Introduction	64
5.2. Etude morphologique des souches	64
5.2.1. <i>Aspergillus</i> V12A25	64
5.2.1.1. Description macroscopique	64
5.2.1.2. Description microscopique	65
5.2.2. <i>Penicillium</i> V33A25	65
5.2.2.1. Description macroscopique	65
5.2.2.2. Description microscopique	67
5.2.3. Identification des souches	67
5.3. Caractéristiques physiologiques sur milieux gélés	68
5.3.1. Croissance apicale	68
5.3.2. Indice de sporulation	69
5.4. Conclusion	71
 6. PHYSIOLOGIE D'<i>Aspergillus</i> V12A25 ET DE <i>Penicillium</i> V33A25 CULTIVES SUR CAFEINE	 73
6.1. Introduction	73
6.2. Influence des paramètres de culture	73
6.2.1. Température d'incubation	74
6.2.2. Milieu de préculture et nature de la source de carbone	76
6.2.2.1. Résultats expérimentaux	77
6.2.2.2. Discussion	79
6.2.3. Effet de la concentration initiale en caféine	80
6.2.3.1. Résultats expérimentaux	81
6.2.3.2. Discussion	84
6.2.4. Influence des oligoéléments	86
6.2.4.1. Choix des facteurs	87
6.2.4.2. Résultats expérimentaux	87
6.2.4.3. Discussion	91
6.3. Optimisation des facteurs essentiels à la dégradation de la caféine	92
6.3.1. Choix des facteurs	93
6.3.2. Résultats expérimentaux du plan d'expérience final	96
6.3.2.1. Remarques générales	96
6.3.2.2. Effets des facteurs expérimentaux sur la dégradation de la caféine	97
6.3.2.3. Effets des facteurs expérimentaux sur la production de biomasse	99
6.3.2.4. Effets des facteurs expérimentaux sur le développement mycélien	99
6.3.3. Conditions optimales de culture d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25	100
6.4. Conclusion	102

7. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE CAFEINE DEMETHYLASE CHEZ	
<i>Aspergillus V12A25</i>	104
7.1. Introduction	104
7.2. Localisation de l'activité caféine déméthylase	105
7.2.1. Recherche dans le surnageant de culture	105
7.2.2. Recherche dans le mycélium	106
7.2.2.1. Sélection d'une méthode de broyage du mycélium	106
7.2.2.2. Localisation de l'activité dans un broyat mycélien	107
7.2.2.3. Qualité de la biomasse d' <i>Aspergillus V12A25</i>	108
7.2.3. Conclusion	109
7.3. Mise au point du dosage de l'activité caféine déméthylase	
sur un extrait intracellulaire brut	110
7.3.1. Conditions initiales	110
7.3.2. Quantité de substrat	111
7.3.3. Durée de la réaction	112
7.3.4. Quantité d'extrait intracellulaire brut	113
7.3.5. Nature des cofacteurs	115
7.3.6. Optimisation du pH et de la température de la réaction	116
7.3.7. Définition des principales conditions opératoires	118
7.4. Effets de divers paramètres sur l'activité caféine déméthylase	120
7.4.1. Effet de divers protecteurs d'enzymes	120
7.4.2. Thermostabilité de l'extrait intracellulaire brut	121
7.4.2.1. Congélation / Lyophilisation	122
7.4.2.2. Températures supérieures à 0°C	122
7.4.3. Nature et force molaire de la solution tampon	123
7.4.4. Influence des cations	124
7.4.5. Effet d'inhibiteurs de cytochromes P-450	126
7.4.6. Bilan des essais enzymatiques complémentaires	127
7.5. Purification préliminaire des déméthylases	128
7.5.1. Séparation des fractions protéiques et salées	129
7.5.1.1. Essais préliminaires	129
7.5.1.2. Séparation sur colonne de dessalage	130
7.5.2. Séparation des protéines par gel filtration	131
7.5.3. Bilan des essais de séparation des protéines	133
7.6. Conclusion	135

8. METABOLISME DE LA CAFEINE ET MECANISME DE REGULATION	137
8.1. Introduction	137
8.2. Métabolisme de la caféine par <i>Aspergillus</i> V12A25 et <i>Penicillium</i> V33A25	137
8.2.1. Identification des premiers intermédiaires de dégradation de la caféine	137
8.2.1.1. Identification des intermédiaires dans les surnageants de culture	137
8.2.1.2. Identification des intermédiaires à partir des essais enzymatiques	140
8.2.2. Dégradation <i>in vitro</i> des méthylxanthines par <i>Aspergillus</i> V12A25	141
8.2.3. Voie métabolique de la caféine	142
8.3. Régulation de la dégradation de la caféine	145
8.3.1. Effet <i>in vivo</i> de la présence d'une source simple d'azote	145
8.3.1.1. Conditions opératoires	145
8.3.1.2. Evolution de l'urée et du sulfate d'ammonium	146
8.3.1.3. Evolution de la caféine	147
8.3.1.4. Comparaison des cinétiques d'utilisation des sources d'azote	149
8.3.1.5. Effets sur la biomasse mycélienne	151
8.3.1.6. Rôle de l'ammonium sur la dégradation de la caféine	155
8.3.2. Etude <i>in vitro</i> de la régulation de la dégradation de la caféine chez <i>Aspergillus</i>	156
8.3.2.1. Inductibilité ou constitutivité des activités déméthylasiques	156
8.3.2.2. Mécanisme de régulation par l'ammonium	158
8.4. Conclusion	160
 9. CONCLUSION GENERALE	 162
 10. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 168

ANNEXES

1. Composition des milieux de culture.
- 2a. Clés dichotomiques d'identification des *Aspergillus*.
- b. Clés dichotomiques d'identification des *Penicillium*.
3. Schémas des inhibiteurs de cytochromes P-450 et de l'acide urique.
4. Compléments de la figure 8.6.

LISTE DES FIGURES

	pages
Figure 2.1 : Représentation développée plane de la caféine et de ses dérivés déméthylés.	6
Figure 2.2 : Voie probable de biosynthèse de la caféine chez <i>Coffea arabica</i> et <i>Camellia</i> spp.	18
Figure 2.3 : Voies de dégradation de la caféine chez l'homme, le rat et la souris.	20
Figure 2.4 : Voie de dégradation de la caféine chez <i>Coffea</i> spp.	22
Figure 2.5 : Voie de dégradation de la caféine chez <i>Pseudomonas putida</i> .	23
Figure 2.6 : Voie de dégradation de la caféine chez <i>Aspergillus niger</i> .	26
Figure 2.7 : Schémas des structures reproductrices des champignons filamenteux appartenant au genre <i>Aspergillus</i> et au genre <i>Penicillium</i> .	29
Figure 2.8 : Cultures d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 par Fermentation en Milieu Solide sur de la pulpe de café, à 25°C. Evolutions de la production de CO ₂ , de la teneur en caféine et du pH.	33
Figure 3.1 : Protocole de régénération d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 cultivées sur milieu gélosé à base de Café Moulu et de Saccharose (CMS).	38
Figure 3.2 : Préparation de l'inoculum à base de conidies et mise en œuvre des cultures liquides pour la dégradation de la caféine.	40
Figure 4.1 : Profil d'élution d'un mélange standard de méthylxanthines en CLHP, avec la phénacétine comme étalon interne : méthode préliminaire.	60
Figure 4.2 : Profil d'élution d'un mélange standard de méthylxanthines en CLHP, avec la β -hydroxyéthylthéophylline comme étalon interne : nouvelle méthode.	60
Figure 5.1 : Cultures de 7 jours à 25°C d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 sur milieux Malt Extract Agar et Czapek-Dox.	66
Figure 5.2 : Indices de sporulation d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 cultivés sur différents milieux, après 3, 4 ou 7 jours d'incubation à 25°C.	70
Figure 6.1 : Cultures d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 en milieu CG à différentes températures d'incubation. Evolutions des vitesses de dégradation de la caféine et des biomasses finales en fonction de la température d'incubation.	75
Figure 6.2 : Cultures d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 en milieux liquides CG et CS, avec précultures sur milieux gélosés CMS, CG ou CS. Evolutions de la biomasse et de la dégradation de la caféine.	77
Figure 6.3 : Cultures d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25, en milieux CS contenant différentes concentrations initiales en caféine. Evolutions de la biomasse et de la dégradation de la caféine.	81
Figure 6.4 : Cultures d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25, en milieux CS. Vitesses maximales de dégradation de la caféine et de production de biomasse en fonction de la concentration initiale en caféine.	82
Figure 6.5 : Vues au microscope optique d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 cultivés en milieux CS à 1 et 5 g.l ⁻¹ de caféine initiale, après 3 jours d'incubation.	85
Figure 6.6 : Cultures d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 en milieux CS contenant divers oligoéléments. Evolutions de la biomasse et de la dégradation de la caféine.	88

Figure 6.7 : Analyse statistique des réponses du plan d'expérience sur l'effet des oligo-éléments. Diagrammes des effets relatifs de chaque oligoélément sur les paramètres étudiés.	89
Figure 6.8 : Cinétiques de dégradation de la caféine pour chaque essai du plan d'expérience final sur <i>Aspergillus</i> V12A25 et <i>Penicillium</i> V33A25.	95
Figure 6.9 : Analyse statistique des réponses du plan d'expérience final. Diagrammes des effets relatifs et degrés d'influence de chaque facteur sur les paramètres étudiés.	98
Figure 7.1 : Effet de la durée de la réaction enzymatique sur la consommation de la caféine dans le volume réactionnel.	112
Figure 7.2 : Effet de la quantité de protéines totales présente dans le volume réactionnel sur l'activité caféine déméthylase.	114
Figure 7.3 : Effets du pH et de la température sur l'activité caféine déméthylase.	117
Figure 7.4 : Effet de protecteurs d'enzymes sur l'activité caféine déméthylase.	121
Figure 7.5 : Sensibilité de l'activité caféine déméthylase aux températures positives.	123
Figure 7.6 : Effet de divers cations sur l'activité caféine déméthylase.	125
Figure 7.7 : Effet d'inhibiteurs de cytochromes P-450 sur l'activité caféine déméthylase.	126
Figure 7.8 : Séparation des protéines d'un extrait intracellulaire d' <i>Aspergillus</i> V12A25 par chromatographie d'exclusion. Profil spectrophotométrique à 280 nm, teneurs en protéines totales des fractions, activités caféine déméthylase des fractions 7 à 21.	132
Figure 8.1 : Culture d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 correspondant aux essais n°2 et n°4 du plan d'expérience final. Profils des principales méthylxanthines libérées dans les surnageants de culture.	138
Figure 8.2 : Profil chromatographique en CLHP des méthylxanthines issues de la dégradation <i>in vitro</i> de la caféine par un extrait intracellulaire brut d' <i>Aspergillus</i> V12A25.	140
Figure 8.3 : Voie de dégradation de la caféine chez <i>Aspergillus</i> V12A25 et <i>Penicillium</i> V33A25.	144
Figure 8.4 : Cultures d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 en milieu CS supplémentés en sulfate d'ammonium ou en urée, à différentes concentrations. Evolutions du sulfate d'ammonium et de l'urée.	146
Figure 8.5 : Cultures d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 en milieux CS supplémentés ou non en sulfate d'ammonium ou en urée. Evolution de la caféine.	148
Figure 8.6 : Cultures d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 en milieux CS, supplémentés ou non en sulfate d'ammonium à 0,68 g.l ⁻¹ , ou en urée à 0,31 g.l ⁻¹ . Evolution du pH et comparaison des cinétiques de consommation de la caféine et de la source simple d'azote.	150
Figure 8.7 : Vues au microscope optique d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 cultivés en milieux CS+100A après 2 à 3 jours d'incubation.	153

LISTE DES TABLEAUX

	pages
Tableau 2.1 : Estimation de la consommation de caféine dans le monde, aux Etats-Unis, au Canada et en Angleterre.	5
Tableau 2.2 : Teneurs en caféine de quelques boissons.	5
Tableau 2.3 : Solubilité de la caféine dans différents solvants en fonction de la température.	7
Tableau 2.4 : Exemples de séparation de la caféine et d'autres composés par Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse.	11
Tableau 2.5 : Principaux effets biologiques et mécanismes d'action de la caféine chez l'homme sain consommant modérément de la caféine sous forme café-boisson ou autre.	13
Tableau 2.6 : Recouvrement de la caféine et de ses métabolites dans les urines, chez l'homme, le rat et la souris. Pourcentages exprimés par rapport à la dose de caféine administrée.	19
Tableau 2.7 : Caractéristiques des activités déméthylases chez <i>Pseudomonas putida</i> .	24
Tableau 2.8 : Principaux domaines d'application des champignons filamenteux appartenant aux genres <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> .	30
Tableau 2.9 : Caractérisation physiologique de huit souches de champignons filamenteux aptes à dégrader la caféine.	33
Tableau 3.1 : Matrice d'Hadarnard à 7 facteurs et 8 essais utilisée pour les plans d'expérience.	49
Tableau 4.1 : Etude de deux systèmes d'extraction : rendements d'extraction de la β -hydroxyéthylthéophylline (β OH-THP) et effet sur la détermination de la concentration en caféine par la méthode de CLHP.	53
Tableau 4.2 : Pourcentages des méthylxanthines restant dans la phase aqueuse après une simple, double ou triple extraction par le système chloroforme/isopropanol à différentes proportions.	54
Tableau 4.3 : Distances de migration des méthylxanthines séparées en CCM par différents solvants de migrations issus de la littérature.	56
Tableau 4.4 : Distances de migration des méthylxanthines séparées en CCM par différents solvants de migrations.	57
Tableau 5.1 : Croissances apicales d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 cultivés sur différents milieux gélosés à 25°C.	68
Tableau 6.1 : Bilan des cultures d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25, pré-cultivés et cultivés sur différents milieux, à 30 et 25°C respectivement.	78
Tableau 6.2 : Cultures d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 en milieux CS à 1, 2, 5 ou 10 g.l ⁻¹ de caféine initiale. Teneurs en sucres totaux résiduels après 3, 4 et 7 jours d'incubation.	83
Tableau 6.3 : Attribution des oligoéléments à chaque facteur du plan d'expérience et définition des niveaux d'expérience.	87
Tableau 6.4 : Valeurs des réponses obtenues pour chaque essai du plan d'expérience sur l'effet des oligoéléments.	89
Tableau 6.5 : Effet des oligoéléments sur la physiologie d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 cultivés en milieux CS contenant divers oligo-éléments. Résultats des essais complémentaires.	91

Tableau 6.6 : Définition de la nature et des niveaux de chaque facteur du plan d'expérience final.	93
Tableau 6.7 : Matrice expérimentale du plan d'expérience final pour <i>Aspergillus</i> V12A25.	95
Tableau 6.8 : Teneurs en sucres totaux résiduels dans chaque essai du plan d'expérience final, après 3 à 6 jours d'incubation.	96
Tableau 6.9 : Valeurs des réponses obtenues pour chaque essai du plan d'expérience final.	98
Tableau 6.10 : Conditions optimales de croissance d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25, cultivés en milieu synthétique liquide à base de caféine.	101
Tableau 7.1 : Bilan des activités caféine déméthylase réalisées sur les différentes fractions protéiques obtenues par centrifugation différentielle d'un broyat mycélien.	107
Tableau 7.2 : Effet de la concentration en caféine sur l'activité caféine déméthylase.	111
Tableau 7.3 : Effet de l'addition de cofacteurs sur l'activité caféine déméthylase.	115
Tableau 7.4 : Exemples de réactions de déméthylation par des systèmes eucaryotes.	119
Tableau 8.1 : Spécificité de substrat d'un extrait intracellulaire brut d' <i>Aspergillus</i> V12A25. Activité déméthylasique et principaux produits formés pour chaque méthylxanthine testée.	142
Tableau 8.2 : Cultures d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 en milieux CS, supplémentés ou non en sulfate d'ammonium ou en urée, à différentes concentrations. Vitesses maximales de dégradation de la caféine et temps estimés pour atteindre 99 % de dégradation de la caféine.	148
Tableau 8.3 : Cultures d' <i>Aspergillus</i> V12A25 et de <i>Penicillium</i> V33A25 en milieux CS, supplémentés ou non en sulfate d'ammonium ou en urée, à différentes concentrations. Biomasses et sucres résiduels après 72 et 90 heures d'incubation.	154

ABREVIATIONS ET GLOSSAIRE

Les termes "déméthylation" et "dégradation" seront indifféremment utilisés dans le texte ; le premier correspondant plus exactement au phénomène étudié

CAF : caféine ou 1,3,7-triméthylxanthine, encore désignée dans le texte par les termes génériques "alcaloïde" et "purine"

THP : théophylline ou 1,3-diméthylxanthine

THB : théobromine ou 3,7-diméthylxanthine

PAR : paraxanthine ou 1,7-diméthylxanthine

7MX : hétéroxanthine ou 7-méthylxanthine

3MX : 3-méthylxanthine

1MX : 1-méthylxanthine

βOH-THP : β-hydroxyéthylthéophylline, étalon interne dans l'analyse des méthylxanthines par chromatographie liquide haute performance

A12 : *Aspergillus* V12A25

P33 : *Penicillium* V33A25

A. : *Aspergillus*

P. : *Penicillium*

Ps. : *Pseudomonas*

CMS : Milieu Café Moulu-Saccharose

CS : Milieu Caféine-Saccharose

CG : Milieu Caféine-Glucose

MEA : Milieu Malt Extract Agar

CD : Milieu Czapek-Dox

CYA : Milieu Czapek Yeast Agar

PDA : Milieu Potato Dextrose Agar

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

UV : lumière Ultra-Violette

Rf : Distance de migration (CCM)

eau milliQ : eau ultrapure (système Millipore)

ACN : Acétonitrile

THF : Tétrahydrofurane

CHCl₃ : Chloroforme

MeOH : Méthanol

PrOH-2 : Propanol-2 ou isopropanol

BuOH : Butanol-1

AcOH : Acide acétique

AcEt : Acétate d'Ethyle

V_{max} caf : vitesse maximale de dégradation de la caféine ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ; correspond à la pente maximale d'une cinétique de disparition de caféine dans un milieu de culture

V_{moy} caf : vitesse moyenne de dégradation de la caféine ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ; rend compte du temps nécessaire à une disparition complète de la caféine initialement contenue dans un milieu de culture

Rapport C/N : rapport du nombre d'atomes de carbone fournis par le saccharose, sur le nombre d'atomes d'azote fournis par la caféine généralement

A.D. : Activité Déméthylasique (généralement activité caféine déméthylase) exprimée en pmoles de méthylxanthine consommée par minute et par mg de protéines totales

EIB : Extrait Intracellulaire Brut

VR : Volume Réactionnel

NADPH : β -nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite

DTT : DL-dithiothréitol

INTRODUCTION

GENERALE

1. INTRODUCTION GENERALE

La caféine ou 1,3,7-triméthylxanthine est un alcaloïde synthétisé par une soixantaine d'espèces végétales, dont les plus connues sont le caféier (*Coffea*) et le thé (*Camellia*). Elle fait partie des substances naturelles pharmacologiquement actives les plus consommées dans le monde, principalement sous forme de boissons (thé, café et Coca-Cola®).

La caféine est essentiellement reconnue pour ses effets stimulants sur le système nerveux central. Cependant, comme la plupart des substances actives, la caféine présente des effets indésirables (augmentation de la diurèse, troubles du sommeil, excitation,...) et potentiellement nuisibles à la santé humaine. Ses propriétés sont notamment à l'origine de nombreuses polémiques concernant la consommation de café qui ont eu pour répercussions la multiplication de recherches dans trois domaines :

- la pharmacologie/santé : établissement du métabolisme de la caféine, définition des modes d'actions de la caféine, etc...
- l'agronomie : recherche de variétés sauvages de caféiers sans caféine, génétique du caféier.
- l'industrie alimentaire : développement des techniques de décaféination.

Les effets néfastes de la caféine ont également été rapportés sur des animaux d'élevage nourris en partie avec de la pulpe de café (CABEZAS et coll., 1978). La pulpe de café représente par son tonnage annuel, le principal sous-produit de l'agro-industrie du café (ZULUAGA, 1989). Elle correspond à la peau et à la partie charnue du café-fruit. Elle est obtenue par "dépulpage" mécanique des fruits fraîchement récoltés (PERRAUD-GAIME, 1995).

Malgré un fort potentiel nutritionnel (richesse en protéines et en sucres), ce résidu agricole n'a pu trouver d'applications importantes dans le domaine de l'alimentation animale, principalement en raison de la présence de facteurs toxiques (caféine) et antinutritionnels (composés phénoliques) (BRESSANI, 1978).

Dans le but de trouver des solutions biotechnologiques pour pallier au problème de toxicité de la pulpe de café, des recherches bilatérales, associant des chercheurs de l'Université Autonome Métropolitaine (UAM) de Mexico et de l'Institut Français de Recherche pour le Développement en Coopération (ORSTOM) de Montpellier, ont été initiées en 1987. Ces travaux se sont inscrits dans un grand programme de valorisation des sous-produits agricoles tropicaux, et ont initialement reçu le soutien financier de la Communauté Européenne (STD 1).

Les recherches du groupe ORSTOM-UAM ont été orientées vers la décaféination de la pulpe de café par voie biologique à l'aide de souches fongiques. Les travaux successifs de AQUIAHUATL et coll. (1988), de ROUSSOS et coll. (1989) et de PERRAUD-GAIME (1995) ont permis de sélectionner une dizaine de champignons filamenteux appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, particulièrement aptes à dégrader la caféine de la pulpe de café (PERRAUD-GAIME et ROUSSOS, 1995).

De nouveaux intérêts ont alors émergé de ces recherches comme la production de "décaféinases" par ces microorganismes cultivés sur de la pulpe de café. L'utilisation de ces enzymes auraient des répercussions indéniables sur toute l'agro-industrie du café, voire du thé. Une autre application réside dans la production de métabolites issus de la déméthylation enzymatique de la caféine (di- et mono-méthylxanthines). Ces molécules présentent des effets pharmacologiques parfois différents de ceux de la caféine. Il serait donc intéressant de pouvoir les produire par un procédé biotechnologique simple, d'autant plus que ces substances ne se trouvent pas en grandes quantités à l'état naturel.

La réalisation de tels projets repose nécessairement sur la maîtrise de la physiologie et du métabolisme de ces souches aptes à dégrader la caféine. Ceci constitue le principal objectif de la présente étude, qui comprendra trois grands volets.

Le premier volet traitera de la mise au point de deux méthodes d'analyse de la caféine et de ses dérivés potentiels obtenus par réaction enzymatique : une méthode qualitative de chromatographie sur couche mince pour la mise en évidence rapide de différents dérivés et une méthode quantitative de chromatographie liquide haute performance pour la mesure précise des concentrations de la caféine ainsi que des méthylxanthines en général.

Le deuxième volet consistera à définir et à optimiser les paramètres environnementaux essentiels à une dégradation rapide et complète de la caféine par les deux champignons sélectionnés lors d'une étude préliminaire (DENIS, 1992). Parallèlement, nous étudierons les effets des conditions de culture sur la croissance mycélienne des souches (production de biomasse et morphologie). Ces travaux seront réalisés en milieu liquide synthétique à base de caféine. Ce choix devait en fait nous permettre d'écarter tout phénomène parasite que l'utilisation d'un substrat complexe comme la pulpe de café aurait inévitablement entraîné.

Le troisième volet décrira le schéma catabolique de la caféine chez ces deux microorganismes. Nous nous attacherons d'une part à définir les principaux intermédiaires métaboliques de cette voie. D'autre part, la mise au point du dosage de l'activité caféine déméthylase chez *Aspergillus* sp. nous permettra de caractériser de manière globale cette activité et de mettre en évidence certains aspects du mécanisme de régulation de la dégradation de la caféine.

L'analyse synthétique des résultats obtenus au cours de ce travail, devrait finalement nous permettre de mieux évaluer les potentialités de ses champignons filamenteux présentant la particularité de dégrader la caféine, et les éventuelles conséquences de leur utilisation comme moyen de valoriser la pulpe de café par la production de métabolites à haute valeur ajoutée.

Une analyse bibliographique exhaustive nous a aidé à faire le point des connaissances actuelles sur la caféine, le métabolisme de la caféine et les champignons filamenteux aptes à la dégrader.

ANALYSE
BIBLIOGRAPHIQUE

2. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

En préambule à la présentation des résultats obtenus au cours de cette étude, il était essentiel de faire le point sur les données bibliographiques concernant la caféine. Dans un premier temps, nous récapitulerons les différentes sources de caféine et les propriétés chimiques et physiologiques de ce composé naturel, qui ont largement contribué au succès mondial de boissons comme le café ou le thé.

Nous nous attacherons dans un deuxième temps à décrire le métabolisme de la caféine en nous focalisant sur les aspects biochimiques de sa biosynthèse par les plantes, et de sa biodégradation par les organismes supérieurs, mais également par certains microorganismes dont les champignons filamenteux.

Le troisième volet de cette analyse bibliographique sera consacré à la présentation des champignons filamenteux et plus particulièrement à celle des deux souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium* sélectionnées pour leur capacité à dégrader la caféine.

2.1. LA CAFEINE

2.1.1. Origine de la caféine et ses différentes sources

La caféine fut isolée pour la première fois en 1820 par Runge et Von Giese, dans les grains de café. En 1827, Oudry isola des feuilles de thé une substance qu'il dénomma "théine", qui fut rapidement reconnue comme étant identique à la caféine. Par la suite, la présence de la caféine a été signalée dans le maté, dans les noix de cola et dans les noix de guarana (ARNAUD, 1987 ; JAMES, 1991 ; DEBRY, 1993).

Plus de soixante espèces végétales contenant de la caféine ont ainsi été référencées dans le monde. Les plus communes appartiennent aux genres : *Coffea*, *Camellia*, *Cola*, *Paullina*, *Ilex* et *Theobroma* (SUZUKI et WALLER, 1988 ; WALLER et coll., 1993).

De par la popularité de boissons telles que le café ou le thé, la caféine est considérée comme l'une des molécules pharmacologiquement actives, les plus consommées dans le monde (SUZUKI et WALLER, 1988 ; JAMES, 1991 ; ROGERS et RICHARDSON, 1993). Le café est reconnu comme la principale source de caféine, suivi par le thé (Tableau 2.1). En France, la consommation annuelle de caféine sous forme de café, est estimée à 150 g par personne (SCHLIENGER et LEVY, 1989). Les teneurs en caféine de quelques boissons sont reprises dans le tableau 2.2.

Tableau 2.1 : Estimation de la consommation de caféine dans le monde, aux Etats-Unis, au Canada et en Angleterre (d'après DEBRY, 1993).

Régions	Sources de caféine	Consommation totale de caféine (t.an ⁻¹)	Consommation par personne (mg.j ⁻¹)
Monde	Café	64 500	38
	Thé	51 500	30
	Autre	4 000	2
	Total	120 000	70
Etats-Unis	Café	10 300	125
	Thé	2 850	35
	Boissons douces	2 850	35
	Cacao	300	4
	Autre	1 000	12
	Total	17 300	211
Canada	Café	1 200	128
	Thé	700	79
	Boissons douces	150	16
	Cacao	30	3
	Autre	120	12
	Total	2 200	238
Angleterre	Café	1 700	84
	Thé	6 500	320
	Autre	800	40
	Total	9 000	444

Tableau 2.2 : Teneurs en caféine de quelques boissons (d'après SCHLIENGER et LEVY, 1989).

<u>Tasse de café (125 ml)</u>	Caféine (mg)
arabica fort	80 à 100
arabica moyen	45 à 50
robusta fort	200 à 250
robusta moyen	100 à 150
café soluble (2 g. par tasse)	50 à 100
café décaféiné	3 à 5
café-chicorée	33 à 40
<u>Autres sources de caféine</u>	
150 ml de thé (feuille ou sachet)	40 à 80
150 mg de thé instantané soluble	32
1 litre de coca-cola	34 à 70
une tasse de chocolat	10 à 40

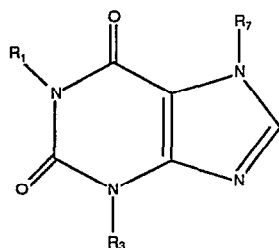
Les autres sources de consommation de caféine sont représentées par les produits chocolatés et les boissons à base de cola. Dans ces dernières, la caféine est essentiellement exogène (JAMES, 1991). Par ailleurs, certaines préparations pharmaceutiques constituent également une source de consommation "non naturelle" de caféine (I.F.T.E.P.F.S.N., 1983 ; JAMES, 1991).

La caféine utilisée en agro-alimentaire comme en pharmacologie est essentiellement issue du procédé de décaféination du café (I.F.T.E.P.F.S.N., 1983 ; JAMES, 1991). Les diverses techniques de décaféination existantes sont présentées dans le paragraphe 2.1.2.2.

2.1.2. Chimie de la caféine

2.1.2.1. Généralités

La caféine est un alcaloïde. Elle appartient à la famille des purines. C'est en fait le nom générique de la 1,3,7-triméthylxanthine, ou 1,3,7-triméthyl-2,6-dioxopurine (MACRAE, 1985 ; ARNAUD, 1987 ; JAMES, 1991). La formule chimique de la caféine a été décrite par Medicus en 1875, et sa synthèse fut réalisée par Fischer en 1895 (DEBRY, 1993). Le schéma de la structure chimique de la caféine est présenté dans la figure 2.1.



Purines	R ₁	R ₂	R ₃
1,3,7-triméthylxanthine (Caféine)	CH ₃	CH ₃	CH ₃
1,3-diméthylxanthine (Théophylline)	CH ₃	CH ₃	H
1,7-diméthylxanthine (Paraxanthine)	CH ₃	H	CH ₃
3,7-diméthylxanthine (Théobromine)	H	CH ₃	CH ₃
1-méthylxanthine	CH ₃	H	H
3-méthylxanthine	H	CH ₃	H
7-méthylxanthine (Hétéroxanthine)	H	H	CH ₃
Xanthine	H	H	H

Figure 2.1 : Représentation développée plane de la caféine et de ses dérivés déméthylés.

Les principales caractéristiques physico-chimiques de la caféine selon WINDHOLZ et BUDAVARI (1983), MACRAE (1985) et ARNAUD (1987), sont les suivantes :

- poids moléculaire : 194,2 g.mole⁻¹
- point de fusion : 236°C ; point de sublimation (pression atmosphérique) : 178°C
- cristallisation sous une forme hydratée en proportion 4/5 (6,9 % d'eau) ; déshydratation complète à 80°C
- $\lambda_{\text{max}} \approx 274$ nm (en solution aqueuse, pH 2 à 14)
- pH d'une solution aqueuse à 1 % : 6,9
- pKa estimé à 14 ; pKb estimé à 14,2
- base très faible formant des sels instables avec les acides ; assez stable dans les solutions acides diluées et les solutions basiques
- moyennement soluble dans l'eau et les solvants organiques (Tableau 2.3)
- solubilité accrue dans l'eau en présence de sels : benzoate, cinnamates, citrates,...
- formation de nombreux complexes avec : chlorogénate de potassium (dans les grains de café), méthylgallate, coumarine, isoeugénol, acide indolacétique, anthocyanidine, dérivés puriques et pyrimidiques, ...
- inodore, incolore (en solution), goût amer caractéristique.

Tableau 2.3 : Solubilité de la caféine dans différents solvants en fonction de la température (d'après ARNAUD, 1987).

Solvants	Temp. (°C)	Solubilité (% p/v)	Solvants	Temp. (°C)	Solubilité (% p/v)
Eau	0	0,6	Méthanol	25	1,14
	15	1,0	Toluène	25	0,58
	20	1,46	Benzène	18-25	0,9-1,0
	25	2,13		100	4,8
	30	2,8	Tétrachlorure de carbone	18	0,09
	40	4,6	Chloroforme	25	15-18,2
	50	6,7-7,7	Dichlorométhane	33	9,0
	60	9,7-12,9	Dichloroéthylène	15-25	1,8
	70	13,5	Trichloroéthylène	15	0,7
	75	28,1		29	1,5
	80	19,2		67	3,0
	100	66,7		85	3,6
Ethanol 95 %	25	1,32	Acétate d'éthyle	18	0,7
Ethanol pur	25	1,5-1,8		25	2,5
	60	4,8		77	4,0
Acétone	25-30	2,0-2,3	Ether éthylique	20	0,1-0,2

L'étude de la solubilité de la caféine, ainsi que d'autres méthylxanthines dans des fluides supercritiques a fait l'objet d'études plus récentes (JOHANNESSEN et BRUNNER, 1994 et 1995). Selon JOHANNESSEN et BRUNNER (1994), la solubilité de la caféine dans le dioxyde de carbone supercritique varie de 1,3 g.kg⁻¹ CO₂ à 200 bars et 156,1°C, à 5 g.kg⁻¹ CO₂ à 350 bars et 178,3°C.

2.1.2.2. Méthodes de décaféination

Il existe principalement trois techniques de décaféination du café par voie physico-chimique, qui ont fait l'objet de nombreux dépôts de brevets. Afin de minimiser les pertes et les changements d'arômes et de saveurs, l'extraction de la caféine est généralement réalisée sur les grains de café non torréfiés. La législation impose un taux résiduel en caféine inférieur à 0,1 % PMS dans le café torréfié décaféiné (ROTHFOS, 1986 ; KATZ, 1987 ; COUGHLIN, 1987 ; STEINHART et MÖLLER, 1993).

Dans son principe, la méthode la plus ancienne et la plus courante, consiste en une extraction de la caféine par solubilisation dans un solvant organique. Cette opération est précédée d'une étape d'humidification des grains, qui rend la caféine plus accessible au solvant. Le rendement de la décaféination augmente avec le degré d'humidification des grains aux dépens de la sélectivité des composés extraits. Le solvant est ensuite éliminé par un courant de vapeur d'eau, et les grains sont séchés afin d'éliminer les traces de solvant et l'excès d'eau. Le solvant est généralement recyclé, et la caféine ainsi récupérée est commercialisée après raffinage.

Aujourd'hui, les solvants organiques couramment utilisés sont le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle (ROTHFOS, 1986 ; STEINHART et MÖLLER, 1993). Bien que les taux résiduels de ces solvants soient fortement limités par les législations en vigueur (moins de 10 ppm), et malgré des études démontrant l'innocuité de ces produits (COUGHLIN, 1987), d'autres méthodes de décaféination ont été développées afin d'écartier tout risque de contamination d'ordre chimique.

La seconde technique de décaféination consiste en une extraction de la caféine à l'eau chaude. Les grains sont plongés dans une infusion de café ayant servi à une précédente extraction, dont la caféine a préalablement été retirée sur différents supports comme le charbon actif, ou à l'aide d'un solvant organique. Le recyclage de la "liqueur" limite les pertes en composés indispensables à la qualité du café (ROTHFOS, 1986 ; KATZ, 1987 ; STEINHART et MÖLLER, 1993).

Enfin, la technique la plus récente consiste en une extraction de la caféine au CO₂ supercritique. Son principe est comparable à celui décrit dans la première méthode. Le fluide utilisé ne présente aucun risque pour la santé. Cependant, l'utilisation de cette technique reste limitée, essentiellement à cause de son coût de production très élevé (ROTHFOS, 1986 ; KATZ, 1987 ; MAZZAFERA et coll., 1991 ; STEINHART et MÖLLER, 1993).

La plupart des études de décaféination par voie physico-chimique ont porté sur le café en grain. Cependant, des travaux ont été réalisés sur d'autres substrats. On citera les études de MOLINA et coll. (1974) sur la détoxification de la pulpe de café. Ces auteurs ont effectué différents traitements tels que la percolation, l'extraction à l'eau à 25°C (suivie ou non d'une extraction à l'éthanol) et l'extraction à l'éthanol, sur de la pulpe fraîche ou sur de la pulpe déshydratée.

Par percolation, le rendement d'extraction de la caféine est de 99 %, et la perte de matières solides totales est de 29 % (essentiellement des sucres totaux). L'extraction à l'alcool est la technique la moins efficace (70 % de caféine extraite), mais elle limite les pertes de matières solides (19 %). Quelque soit la méthode utilisée, la pulpe décaféinée présente une toxicité réduite chez le rat par rapport au témoin. Cependant, sa valeur nutritionnelle reste faible. D'où l'intérêt de mettre au point une technique de biodégradation de la caféine à l'aide de microorganismes, permettant en plus, un enrichissement protéique de la pulpe de café (ROUSSOS et coll., 1995).

2.1.3. Méthodes d'analyse de la caféine

Les premières méthodes d'analyse de la caféine dans les produits à base de café (méthodes de Bailey-Andrew), étaient basées sur une détermination par gravimétrie ou sur un dosage de l'azote ammoniacal de l'alcaloïde, après son extraction au chloroforme (MACRAE, 1985). Par la suite, diverses méthodes se sont appuyées sur la propriété de la caféine à présenter un maximum d'absorption à une longueur d'onde de 272 à 276 nm (MACRAE, 1985). Mais ces méthodes nécessitaient une étape préalable de clarification afin d'éliminer les différents composés responsables d'interférences. La méthode développée par ISHLER et coll. (1948) est un exemple parmi toutes les méthodes spectrophotométriques de ce type, où les impuretés sont éliminées par un traitement à l'oxyde de magnésium ou au ferrocyanide de zinc.

A de rares exceptions près, l'extraction de la caféine et de ses dérivés a toujours été, et reste une étape préliminaire indispensable à toute analyse des méthylxanthines, quelque soit la méthode de dosage utilisée. Les principales raisons de cette opération sont l'élimination des interférences et la concentration des métabolites (MACRAE, 1985 ; SUZUKI et WALLER, 1988). L'extraction de la caféine peut être évitée lorsque la molécule est dosée dans un milieu limpide, comme certains milieux de culture synthétiques. La mesure spectrophotométrique directe permet alors un dosage de toutes les méthylxanthines sans distinction, puisque ces molécules présentent toutes un maximum d'absorption à une longueur d'onde identique (KUTZMAN et SCHWIMMER, 1971 ; MIDDELHOVEN et BAKKER, 1982).

Les autres méthodes de dosages de la caféine et des méthylxanthines sont des méthodes chromatographiques. Chronologiquement, les premières méthodes étaient basées sur le principe de la chromatographie de surface sur papier, puis sur plaque de silice. L'évaluation quantitative des méthylxanthines était réalisée par spectrophotométrie après récupération des composés séparés (WOOLFOLK, 1975 ; BLECHER et LINGENS, 1977). Par la suite, l'utilisation de scanners (détection UV) a permis une lecture directe des chromatographes (HOHNLOSER et coll., 1980 ; GLÜCK et LINGENS, 1987).

Parallèlement, l'étude du métabolisme de la caféine chez les plantes a conduit à l'utilisation de produits radiomarqués (SUZUKI et WALLER, 1988). Ces produits étaient également séparés par chromatographie de surface puis récupérés et quantifiés à l'aide d'un compteur à scintillation (SUZUKI et TAKAHASHI, 1975 ; ROBERT et WALLER, 1979 ; NEGISHI et coll., 1985a). Par ailleurs, certains auteurs ont utilisé la spectrométrie de masse (couplée à la chromatographie en phase gazeuse) pour confirmer l'identification des méthylxanthines séparées par chromatographie sur couche mince (WALLER et coll., 1983 ; SUZUKI et WALLER, 1984a).

Actuellement, la plupart des méthodes d'analyse de la caféine et de tous ses dérivés s'appuie sur la technique de Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP), couplée à un système de détection UV. Ces méthodes ont pour finalités :

- le dosage des méthylxanthines dans les boissons et les aliments,
- la détermination du pool endogène des méthylxanthines produites dans les plantes,
- l'analyse pharmacocinétique des méthylxanthines,
- le dosage des produits de dégradation de la caféine obtenus *in vitro*, à partir d'extraits de cellules animales, végétales ou microbiennes.

La méthode de CLHP la plus répandue est la chromatographie en phase inverse greffée. La technique en phase inverse avec appariement d'ions est plus rarement utilisée. Le tableau 2.4 décrit quelques unes de ces méthodes recensées dans la littérature. VERGNES et coll. (1988) ont comparé différentes techniques de dosage des métabolites potentiels de la caféine par chromatographies d'adsorption classique (support silice) ou en phase inverse, avec ou sans appariement d'ions. Les auteurs ont démontré que la chromatographie en phase inverse permet d'étudier un plus grand nombre de molécules que la chromatographie d'adsorption. De plus, la mise en jeu du phénomène d'appariement d'ions modifie l'ordre d'élution de certains composés, et peut donc servir à confirmer des identifications délicates.

Enfin, deux autres techniques originales ont été récemment proposées pour le dosage de la caféine dans des aliments ou dans les grains de café. Dans le premier cas, il s'agit d'une technique d'électrophorèse capillaire (HURST et MARTIN, 1993), et dans le deuxième cas, il s'agit d'une technique de gel filtration (DE MARIA et coll., 1995). Comparées à des techniques d'analyse par chromatographie liquide haute performance, ces deux méthodes se sont montrées toutes aussi performantes à doser la caféine.

Tableau 2.4 : Exemples de séparation de la caféine et d'autres composés par Chromatographie Liquide Haute Performance en phase Inverse.

Produits analysés	Colonne	Elution/Débit	Phase mobile	Détection	Composés analysés	Réf. biblio.
Fruits de <i>Coffea</i> spp. (contenu endogène et métabolisme de la [8- ³ H]caféine)	5 µm ODS Hypersil (250 x 4,6 mm d.i.)	Grad. 20 min. 1 ml.min ⁻¹	A. acétate 50 mM, pH 5,0. B. MeOH. B dans A de 0 à 35 % en linéaire	UV 270 nm et radio-activité	CAF, THP, THB, 3MX, 7MX, XAN	MAZZAFERA et coll. (1991)
<i>Coffea arabica</i> (cal ou extrait intracellulaire de cal)	10 µm LiChrosorb RP-18 (300 x 4 mm d.i.)	Isoc.	Système 1 : MeOH 25 % dans l'eau Système 2 : MeOH 18 % en tampon phosphate 20 mM, pH 5,7	UV 271 nm	Système 1 : CAF, THB Système 2 : CAF, THB, 7MX	BAUMANN et coll. (1983)
Médicament (Frenadol TM)	5 µm Shandon Hypersil Phenyl-2 (250 x 4,6 mm d.i.) 40°C	Isoc. 2 ml.min ⁻¹	ACN/Eau 5:95 (v/v), contenant : sulfate de tétrabutylammonium 125 mM, acide 1-pentanesulfonique 1 mM et NaH ₂ PO ₄ 50mM.	UV 210 nm	CAF, acide ascorbique, dextrometorphan HBr, paracétamol, acide citrique, acide maléique, maléate de chlorpheniramine	THOMAS et coll. (1994)
Urine	5 µm ODS2 Spherisorb (250 x 4,5 mm d.i.)	Grad. 25 min. 1 ml.min ⁻¹	A. AcOH 0,5 %. B. ACN. B dans A par paliers	UV 280 nm	1MX, 3MX, 7MX, THB, MMUs, DMUs, AAMU (s.i. : 4-acétaminophénol)	DOBROCKY et coll. (1994)
Urine et plasma	ChromSep (100 x 4,5 mm d.i.)	Isoc. ≈ 9 min. 1 ml.min ⁻¹	Acétate de sodium 10 mM/THF 992:8 (v/v)	UV 280 nm	CAF, THP, PAR, TMU (s.i. : β-hydroxyéthyl-THP)	
Métabolites produits par : cellules d'hamster et cellules hépatiques de rat	5 µm Nucleosil (250 x 4 mm d.i.) 27°C	Grad. 30 min. 1,4 ml.min ⁻¹	A. tampon acétate 0,1 M, pH 4/THF/Eau 5:0,6:94,4 (v/v/v). B. tampon acétate 0,1 M, pH 4/THF/ACN/Eau 5:1,5:7:86,5 (v/v/v/v). B dans A par paliers	UV 280 nm	CAF, THP, THB, PAR, 1MX, 3MX, 7MX, AFMU, MMUs, DMUs, TMU (s.i. : hydroxypropyl-THP)	FUHR et coll. (1992)
Métabolites produits par : microsomes hépatiques de l'homme	ODS Ultrasphere (250 x 4,6 mm d.i.) 40°C	Isoc. 25 min. 1,3 ml.min ⁻¹	AcOH 0,05 %/MeOH 88:12 (v/v)	UV 273 nm	CAF, THP, THB, PAR (s.i. : acide 1,7-diméthylurique et 7MX)	GRANT et coll. (1987)
Métabolites produits par : microsomes et cellules hépatiques de l'homme	5 µm Nucleosil C18 (250 x 4,6 mm d.i.)	Grad. 70 min. 1 ml.min ⁻¹	A. THF/AcOH/ACN/Eau 3,3:2,7:10:984 (v/v/v/v). B. = A avec 7,5:2,75:75:914,75 (v/v/v/v). B dans A par paliers	UV 280 nm	CAF, THP, THB, PAR, 1MX, 3MX, 7MX, AFMU, DAU, MMUs, DMUs, TMU (s.i. : 8-chloro-THP)	BERTHOU et coll. (1989)
Surnageant de culture de <i>Pseudomonas putida</i>	M&S pack C18 (150 x 4,6 mm d.i.)	Isoc. 1,5 ml.min ⁻¹	AcOH 1 %/MeOH 80:20 (v/v)	UV 273 nm	CAF, THB	ASANO et coll. (1993)
Boissons non alcoolisées	5 µm ODS Ultrasphere (150 x 4,6 mm d.i.)	Isoc.	Eau/MeOH/AcOH 33 % 49:50:1 (v/v/v)	UV 254 nm	CAF (s.i. : acide acétyl-salicylique)	GALASKO et coll. (1989)
Boissons "soft drinks"	µ-Bondapak C18 (300 x 4 mm d.i.) 25°C	Isoc. 37 min. 2 ml.min ⁻¹	AcOH glacial 5 % dans l'eau	UV 254 nm	CAF, saccharine, benzoate de sodium	SMYLY et coll. (1976)

Isoc. : isocratique, Grad. : gradient, d.i. : diamètre interne, s.i. : standard interne, AcOH : acide acétique, MeOH : méthanol, ACN : acétonitrile, THF : tétrahydrofurane.
CAF : caféine, THP : théophylline, THB : théobromine, PAR : paraxanthine, 1MX : 1-méthylxanthine, 3MX : 3-méthylxanthine, XAN : xanthine.
TMU : acide 1,3,7-triméthylurique, DMUs : acides diméthyluriques, MMUs : acides monométhyluriques, AAMU ou AFMU : 5-acétylamino-6-formyl-amino-3-méthyluracil.

2.1.4. Effets biologiques de la caféine

2.1.4.1. Rôle chez le caféier

L'importance physiologique de la caféine au sein des plantes qui la synthétisent, est encore obscure. Il est cependant certain que cet alcaloïde joue un rôle dans le métabolisme général des purines et des acides nucléiques. Par contre, la caféine ne semble pas constituer une forme de réserve azotée chez le caféier (SUZUKI et coll., 1992 ; WALLER et coll., 1993).

A l'inverse, le rôle écologique de la caféine est mieux défini. Cet alcaloïde présente un effet toxique sur les insectes, les champignons et les plantes, et agit ainsi comme un agent protecteur de la plante (BAUMANN et FRISCHKNECHT, 1988). Le caféier présente à ce titre un système de défense très adapté, car la caféine est préférentiellement synthétisée dans les organes exposés à la prédation (graines, jeunes pousses, jeunes feuilles).

La caféine est par ailleurs excrétée dans le sol lors de la germination des grains du caféier. Elle va ainsi inhiber la germination et le développement des graines d'autres végétaux (BAUMANN et GABRIEL, 1984 ; BAUMANN ET FRISCHKNECHT, 1988 ; WALLER et coll., 1989). Dans les plantations de café, on peut alors retrouver de fortes quantités de caféine dans le sol qui sont à l'origine d'un phénomène d'autotoxicité se traduisant par une réduction de la durée de vie des caféiers (WALLER et coll., 1989).

2.1.4.2. Effets chez l'homme

Les effets de la caféine chez l'homme comme chez les animaux de laboratoire font l'objet de très nombreuses études qui ont donné lieu à plusieurs ouvrages de synthèse. Les travaux portent généralement sur les effets de l'absorption directe de caféine ou de la consommation de café-boisson. Toutes les études s'accordent pour mettre en avant que les effets de la caféine dépendent des doses ingérées, des durées d'exposition et du terrain rencontré.

Les données pharmacocinétiques sur la caféine sont également très nombreuses. La caféine ingérée est rapidement absorbée et distribuée dans le corps par le sang (15 à 60 min.). Elle présente un volume de distribution identique à celui de l'eau corporelle, et pénètre aisément dans tous les organes et dans tous les tissus, sans s'y accumuler. Le temps de demi-vie de la caféine est très variable selon les individus. Il est influencé par de nombreux facteurs, comme le tabagisme. Chez l'homme adulte, le temps de demi-vie de la caféine est de 2,5 à 4,5 heures.

Les principaux effets biologiques de la caféine (pour des doses faibles à moyennes) ainsi que les modes d'action de cet alcaloïde, recensés chez l'homme par plusieurs auteurs, sont résumés dans le tableau 2.5. Les ouvrages les plus complets sur ce sujet sont : DEWS (1984) ; ARNAUD (1987) ; STAVRIC (1988b) ; JAMES (1991) ; DEBRY (1993) ; GARATTINI (1993). Des informations plus ponctuelles sont données par : I.F.T.E.P.F.S.N. (1983) ; MACRAE (1985) ; SMITH (1985) ; COHEN (1986) ; SCHLIENGER et LEVY (1989) ; CARBÓ et coll. (1989) ; BARONE et GRICE (1990).

Tableau 2.5 : Principaux effets biologiques et mécanismes d'action de la caféine chez l'homme sain consommant modérément de la caféine sous forme café-boisson ou autre
(d'après ARNAUD, 1987 ; JAMES, 1991 ; DALY, 1993 ; DEBRY, 1993).

Systèmes affectés	Effets biologiques de la caféine
SNC (Système Nerveux Central)	Effet stimulateur Légère stimulation de l'activité électrique cérébrale (modification de l'électro-encéphalogramme) ; stimulation de divers centres cérébraux ↓ du débit sanguin des vaisseaux cérébraux ; effet vasoconstricteur <i>à plus fortes doses</i> : accroissement des taux d'utilisation locale de glucose ; stimulation de la formation et de la libération de neurotransmetteurs et d'hormones ↑ : vigilance, sensation de bien-être, facultés intellectuelles (légèrement), délai dans l'endormissement (anxiété et stress pour de plus fortes consommations) ↓ : sensations de fatigue et d'ennui, temps de sommeil
Système cardio-vasculaire	léger effet hypertenseur effet vasodilatateur <i>à plus fortes doses</i> : effets inotropes (contractilité cardiaque) et chronotropes (rythme cardiaque) positifs
Fonctions rénales	↑ diurèse par augmentation de la filtration glomérulaire et diminution de la résorption tubulaire
Système gastro-intestinal	↑ les sécrétions gastriques ↑ : sécrétion intestinale d'eau et de sodium, absorptions de macromolécules ou de l'alcool relaxant du muscle lisse intestinal
Système respiratoire	effet vasodilatateur (↑ du débit sanguin dans les poumons) et broncho-relaxant (↑ de la ventilation)
Métabolisme énergétique	↑ le métabolisme de repos (10 %) et la thermogénèse ↑ la lipolyse et l'oxydation des graisses (pas d'effet sur le métabolisme glucidique)
Mécanismes d'action : L'effet antagoniste compétitif de la caféine au niveau des récepteurs A1 et A2 de l'adénosine, explique une majorité des effets biologiques de la molécule aux doses "normales" ingérées. Autres mécanismes, nécessitant de fortes doses de caféine : la mobilisation du calcium intracellulaire, l'inhibition des phosphodiésterases, l'antagonisme au niveau des récepteurs des benzodiazépines.	

Les effets biologiques dus à l'ingestion de grandes quantités de caféine relèvent plutôt de cas pathologiques ou de traitements thérapeutiques. On estime la dose létale de caféine à 10 grammes chez l'homme (soit l'équivalent de 75 à 100 tasses de café fort absorbées en 30 min. !). Néanmoins, l'abus de café (plus de 6 tasses par jour soit plus de 600 mg de caféine par jour) peut conduire à une intoxication chronique à la caféine, dénommée caféinisme. Cette maladie se caractérise principalement par des tremblements, des insomnies, de la nervosité, de l'anxiété et de l'irritabilité, ainsi que des troubles gastro-intestinaux et cardiaques. Les phénomènes d'accoutumance mais également de dépendance à la caféine ont été démontrés chez l'homme. Le sevrage en caféine est aussi source de nombreux symptômes. Enfin, il est reconnu que le café est incitateur à un renforcement de sa propre consommation (voir notamment le point de vue de ROGERS et RICHARDSON, 1993).

La caféine n'est pas la seule méthylxanthine à provoquer des effets biologiques. La théophylline et la théobromine ont également des pouvoirs physiologiques importants, plus ou moins comparables à ceux de la caféine (STAVRIC, 1988a,c ; JAMES, 1991). ARNAUD (1987) a souligné que la 1-méthylxanthine et la 3-méthylxanthine présentent des spectres d'activités pharmacologiques similaires à ceux des autres méthylxanthines. Par contre, la paraxanthine n'est pas très active (ARNAUD, 1987 ; STAVRIC, 1988c).

2.1.4.3. Effets inhibiteurs et mutagènes

Les concentrations en caféine rencontrées chez l'homme et issues d'une consommation modérée de café-boisson, ne semblent présenter aucune action génotoxique, mutagène ou cancérogène potentielle (HAYNES et COLLINS, 1984 ; AESCHBACHER, 1988 ; JAMES, 1991 ; DEBRY, 1993 ; NEHLIG et DEBRY, 1994). Les teneurs nécessaires à l'observation de manifestations mutagènes seraient en fait supérieures ou égales à celles entraînant des effets toxiques directs *in vivo*.

Par contre, la caféine présente un effet mutagène certain, chez les bactéries et les champignons (KIHLMAN, 1974 ; HAYNES et COLLINS, 1984). Néanmoins, elle ne se présente pas comme un agent mutagène très puissant, puisque des doses minimales de 0,1 à 1 g.l⁻¹ sont nécessaires pour provoquer ce phénomène. L'inhibition de la croissance des microorganismes en présence de caféine est généralement réversible (KOCH, 1956 ; PUTRAMANT et coll., 1972). La sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis de la caféine (comme celle des cellules animales) est en fait assez variable et on compte plusieurs souches résistantes à ses effets parmi toutes les familles bactériennes et fongiques (HAYNES et COLLINS, 1984 ; BUCHANAN et coll., 1987 ; PEARSON et MARTH, 1990 ; BENKÖ et SIPICZKI, 1993).

La caféine agit indirectement sur tout type de cellule, soit en potentialisant les effets d'un grand nombre d'agents mutagènes physiques et chimiques, soit en les inhibant (KIHLMAN, 1974 ; ROBERTS, 1984 ; JAMES, 1991 ; NEHLIG et DEBRY, 1994). Le mécanisme antimutagène de la caféine s'expliquerait par un effet de stabilisation des protéines particulièrement fragiles, et/ou des modifications post-traductionnelles (NEHLIG et DEBRY, 1994). En tant qu'agent mutagène, la caféine agit à plusieurs niveaux :

- elle interfère dans le métabolisme des purines et des acides nucléiques (la caféine agit comme un analogue des purines)
- elle potentialise les aberrations chromosomiques lors de la mitose et de la méiose (la caféine raccourcit la phase G₂ de la mitose et donc diminue le temps nécessaire à la réparation de l'ADN endommagé ; elle induit une condensation précoce des chromosomes dans les cellules en phase S et diminue les fréquences de recombinaison ; etc...)
- elle interfère dans différents systèmes de réparation de l'ADN (après les étapes d'excision ou de réplication)
- elle est capable de se complexer à l'ADN simple brin ou de s'insérer entre les bases de l'ADN double brin.

Enfin, quelques auteurs ont étudié l'effet de la caféine sur la croissance et la production de mycotoxines par diverses souches de champignons filamenteux (BUCHANAN et FLETCHER, 1978 ; BUCHANAN et coll., 1981 ; BUCHANAN et coll., 1983a ; MOSS et coll., 1990). Il apparaît que la caféine affecte plus la production de mycotoxines que la production de biomasse. BUCHANAN et coll. (1983b) ont confirmé ces résultats chez *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, en précisant que l'inhibition de la synthèse des mycotoxines était spécifique à la caféine ; la théophylline ou la théobromine n'ayant que peu d'effet. D'après ces auteurs, les mécanismes d'inhibition de la synthèse des mycotoxines et de la croissance mycélienne par la caféine, seraient donc différents.

2.1.5. Applications de la caféine

2.1.5.1. Applications thérapeutiques

L'utilisation de la caféine la plus répandue au niveau thérapeutique, réside dans le traitement de l'apnée du nouveau-né (STAVRIC, 1988b ; JAMES, 1991). Il a été démontré que la caféine est plus performante que la théophylline pour traiter ce type d'affection. Par contre, la théophylline est plus souvent utilisée que la caféine dans les traitements de troubles respiratoires tel que l'asthme (STAVRIC, 1988a,b ; JAMES, 1991).

La caféine est également utilisée en fécondation *in vitro* car elle permet d'augmenter la mobilité des spermatozoïdes, après leur décongélation.

Par ailleurs, la caféine entre dans la composition de différentes préparations pharmaceutiques, parfois dites de confort, incluant des stimulants, des analgésiques, des diurétiques, des coupe-faim,... On retrouve aussi de la caféine dans des préparations pour les traitements de l'acnée (et autres problèmes de peau), de l'obésité, de certaines allergies, ou encore de l'hyperactivité chez l'enfant (SMITH, 1985 ; ARNAUD, 1987 ; STAVRIC, 1988b ; JAMES, 1991).

La caféine peut inhiber ou potentialiser les effets de quelques médicaments mais aussi protéger l'organisme contre certains de leurs effets toxiques (DEBRY, 1993). De même, à fortes doses, cet alcaloïde accroît le pouvoir antitumoral de certaines substances (JAMES, 1991).

2.1.5.2. Autres applications

Dans le milieu médical, la caféine est également utilisée pour mettre en évidence certains troubles hépatiques (BERODE et coll, 1990 ; TANAKA et coll, 1992), ainsi que l'hyperthermie maligne. Parallèlement, la caféine demeure une molécule modèle en recherche biomédicale et pharmacologique (JAMES, 1991).

De par ses effets stimulants, la caféine a également été utilisée pour améliorer les performances sportives (JAMES, 1991 ; DEBRY, 1993). Bien que les études sur ce sujet aient donné des résultats assez contradictoires, la caféine a néanmoins été ajoutée à la liste officielle des produits interdits dans le sport du Comité International Olympique (CARBÓ et coll., 1989).

L'agro-alimentaire est le deuxième domaine d'application de la caféine (I.F.T.E.P.F.S.N., 1983 ; ARNAUD, 1987). Son goût amer caractéristique en a fait une des principales substances de référence pour les tests organoleptiques. La caféine est utilisée comme agent de flaveur en alimentaire. Si on la retrouve en confiserie et en pâtisserie, c'est essentiellement dans les boissons de type soda (Coca-cola, Pepsi-cola,...) que cette substance est ajoutée, plus pour ces effets stimulants que pour ses caractéristiques organoleptiques (ARNAUD, 1987 ; GALASKO et coll., 1989). Ainsi, environ 95 % de la caféine contenue dans une boisson à base de cola est exogène (JAMES, 1991).

2.2. METABOLISME DE LA CAFÉINE

Si la biosynthèse de la caféine est spécifique de quelques espèces végétales, sa biodégradation est réalisée par les êtres supérieurs, certaines plantes et certains microorganismes. L'anabolisme de la caféine a essentiellement été étudié chez le caféier et le thé. Le catabolisme de la caféine a principalement été étudié chez l'homme et les mammifères, où elle empreinte la voie classique d'élimination des xénobiotiques. Chez les plantes qui la synthétisent, la caféine est également dégradée. Enfin, quelques microorganismes présentent la particularité de dégrader cet alcaloïde, et d'assimiler l'azote ainsi libéré.

Dans tous les cas, les intermédiaires de transformation de la caféine ont été identifiés et varient sensiblement d'un type d'organisme à un autre. Les enzymes impliquées dans la biodégradation de la caféine sont assez bien connues chez l'homme et les mammifères. Par contre, elles ont très rarement été purifiées chez les végétaux et les microorganismes. Il en est de même pour les enzymes de biosynthèse de la caféine.

2.2.1. Biosynthèse de la caféine

La biosynthèse de la caféine a principalement été étudiée chez les espèces *Coffea arabica* pour le café, et *Camellia sinensis* pour le thé (SUZUKI et WALLER, 1988 ; SUZUKI et coll., 1992 ; WALLER et coll., 1993).

Chez *Coffea arabica*, la caféine est synthétisée dans le péricarpe et transportée vers le grain où elle s'accumule pendant la maturation du fruit (BAUMANN et WANNER, 1972 ; SUZUKI et WALLER, 1984b et 1985). La caféine se retrouve également dans les fleurs et dans les feuilles, où elle est synthétisée durant la phase de développement de celles-ci (FUJIMORI et ASHIHARA, 1994). Par contre, chez *Camellia sinensis*, la caféine est principalement synthétisée dans les feuilles et se retrouve dans les fleurs et le péricarpe des fruits, mais rarement dans les graines (WALLER et coll., 1993 ; SUZUKI et WALLER, 1985). De faibles quantités de théobromine sont souvent associées à la caféine, chez les deux plantes. Enfin, des traces de théophylline se retrouvent uniquement dans le péricarpe du fruit mature du caféier.

La voie de synthèse de la caféine est relativement bien connue. Elle s'articule notamment autour d'un intermédiaire clé : la xanthosine (NEGISHI et coll., 1985a,c), elle-même issue du métabolisme des purines. Ainsi, dans le caféier comme dans le thé, la caféine est produite à partir de la xanthosine *via* la 7-méthylxanthosine, la 7-méthylxanthine et la théobromine (Figure 2.2). La S-adénosyl-L-méthionine représente la source de groupements méthyles (SUZUKI et WALLER, 1988 ; SUZUKI et coll., 1992 ; WALLER et coll., 1993).

Chaque étape de méthylation est régie par une enzyme spécifique du type *N*-méthyltransférase. Les activités *N*-méthyltransférase ont été largement étudiées à partir d'extraits cellulaires bruts de feuilles, de fruits en développement, ou de cultures de cellules (SUZUKI et TAKAHASHI, 1975 ; ROBERTS et WALLER, 1979 ; WALLER et coll., 1980 ; BAUMANN et coll., 1983 ; WALLER et coll., 1983 ; NEGISHI et coll., 1985b ; MAZZAFERA et coll., 1994a). Curieusement, la paraxanthine est plus active que la théobromine pour la production *in vitro* de caféine. A partir d'un extrait protéique brut de feuilles, ROBERTS et WALLER (1979) ont déterminé des valeurs de K_M de 0,07 et 0,2 mM pour la paraxanthine et la théobromine respectivement. Cependant, la paraxanthine est trop faiblement produite à partir de la 7-méthylxanthine ou de la 1-méthylxanthine, pour pouvoir être considérée comme un précurseur naturel de la caféine (WALLER et coll., 1980). Les principales activités enregistrées chez *C. arabica* sont de l'ordre de 3 à 7 pmoles de caféine ou de théobromine formée par mg de protéines, à partir de théobromine ou de 7-méthylxanthine respectivement (MAZZAFERA et coll., 1994a).

Les méthyltransférases sont connues pour être assez instables (ROBERTS et WALLER, 1979 ; WALLER et coll., 1980). Néanmoins, MAZZAFERA et coll. (1994b) ont récemment purifié l'enzyme responsable de la transformation de la théobromine en caféine, à partir de feuilles et d'albumen du fruit de *C. arabica* var. Laurina. Les caractéristiques de cette méthyltransférase sont : K_M : 0,196 et 0,496 mM pour la théobromine et la 7-méthylxanthine respectivement ; PM : 54 à 60 kDa ; pI : 4,8 à 5,1.

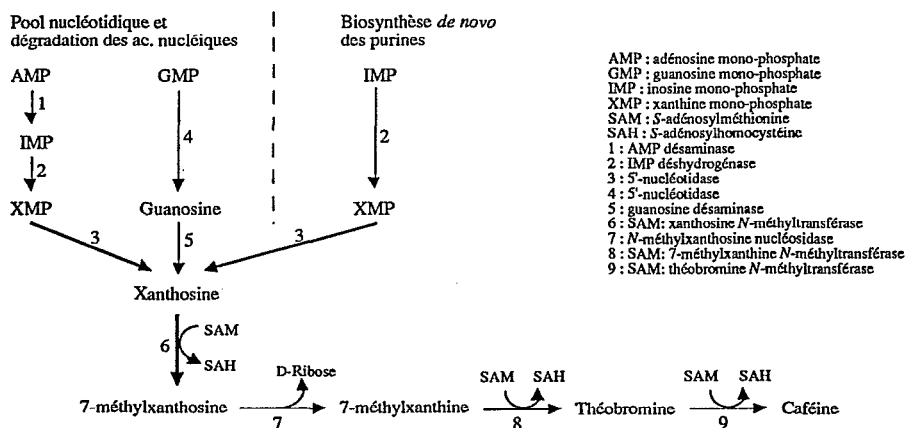


Figure 2.2 : Voie probable de biosynthèse de la caféine chez *Coffea arabica* et *Camellia* spp. (d'après WALLER et coll., 1993).

2.2.2. Biodégradation de la caféine

2.2.2.1. Chez l'homme

Le métabolisme de la caféine est bien connu chez l'homme et les animaux, et fait l'objet de nombreuses études. D'importants ouvrages de synthèse ont été publiés sur ce thème par ARNAUD (1984, 1987 et 1993).

L'essentiel de la caféine ingérée par l'homme franchit la barrière intestinale. La caféine est distribuée par le sang dans tout l'organisme, mais n'est transformée que dans le foie. Les métabolites sont éliminés dans les urines. Seulement 0,5 à 2 % de caféine se retrouve sous forme inchangée dans les urines, en raison de sa forte métabolisation et surtout de son importante réabsorption tubulaire (98 %). Par ailleurs, 2 à 5 % de la caféine ingérée et de ses métabolites est excrétée dans les fèces (ARNAUD, 1993).

Tableau 2.6 : Recouvrement de la caféine et de ses métabolites dans les urines, chez l'homme, le rat et la souris. Pourcentages exprimés par rapport à la dose de caféine administrée (d'après ARNAUD, 1993).

Métabolites	Homme	Rat	Souris
Caféine	1,2	3	2
Acide triméthylurique	1,3	8	4
Triméthyllallantoïne	-	7	0,4
6-amino-5-[N-formylméthylamino] 1,3-diméthyluracile	1,1	20	9
Paraxanthine	6	12	14
3-β-D-paraxanthine glucuronide	-	-	19
Théophylline	1	6	0,7
Théobromine	2	8	4
Acide 1,7-diméthylurique	6	5	6
Acide 1,3-diméthylurique	2,5	4	7
Acide 3,7-diméthylurique	0,8	traces	1
Diméthyllallantoïne	-	traces	traces
6-amino-5-[N-formylméthylamino] 3-méthyluracile	2,4	2,5	1,4
6-amino-5-[N-formylméthylamino] 1-méthyluracile	2	6	5
1-méthylxanthine	18	5	6
7-méthylxanthine	7	2	3
3-méthylxanthine	3	1	2
Acide 1-méthylurique	25	6	8
Acide 7-méthylurique	-	0,8	1
Acide 3-méthylurique	0,1	0,3	2
5-acétylamino-6-formylamino-3-méthyluracile	15	-	-
α-[7-(1,3diméthylxanthinyl)]méthyl méthylsulfoxyde	-	traces	traces
α-[7-(1,3diméthylxanthinyl)]méthyl méthylsulfide	-	-	traces
α-[7-(1,3diméthylxanthinyl)]méthyl méthylsulfone	-	-	traces
N-méthylurée	-	traces	-
NN'-diméthylurée	-	traces	-

La répartition tant qualitative que quantitative des produits issus de la transformation de la caféine, souligne la diversité du métabolisme de l'alcaloïde entre les espèces (Tableau 2.6). La différence majeure entre le métabolisme de la caféine de l'homme et celui des rongeurs, réside dans la proportion de dérivés triméthylés formés, qui est de 40 % chez les rongeurs pour seulement 6 % chez l'homme. La figure 2.3 présente le métabolisme de la caféine chez l'homme, le rat et la souris, proposé par ARNAUD (1993).

La caféine subit simultanément dans les microsomes hépatiques plusieurs types de transformations : *N*-déméthylations, *C8*-oxydations et formation de dérivés uraciles (ARNAUD, 1993). Ces réactions enzymatiques impliquent plusieurs isoformes de cytochromes P-450 (CYP), exceptée la *C8*-oxydation de la 1-méthylxanthine en acide 1-méthylurique, attribuée à la xanthine oxydase. La première étape de transformation de la caféine chez l'homme correspond pour 80 % à une *N3*-déméthylation, conduisant à la formation de paraxanthine. Elle est due au CYP 1A2. Par contre, les *N1*- et *N7*-déméthylations de la caféine ainsi que les réactions de *C8*-oxydations sont le fait d'autres isoformes de CYP (LELO et coll., 1986 ; FUHR et coll., 1992).

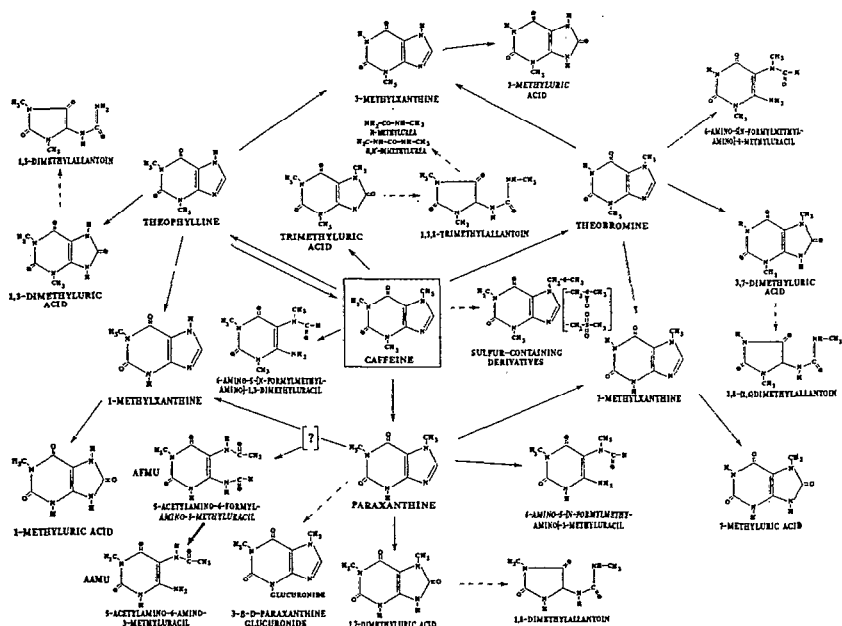


Figure 2.3 : Voies de dégradation de la caféine chez l'homme, le rat et la souris (d'après ARNAUD, 1993). Les flèches en pointillés correspondent aux transformations réalisées uniquement chez les rongeurs.

Les cytochromes P-450 impliqués dans la dégradation de la caféine, font partie d'un complexe enzymatique membranaire localisé au niveau du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques. Ces hémoprotéines sont des mono-oxygénases qui catalysent diverses réactions conduisant à la formation de plusieurs produits à partir d'un substrat. Le système enzymatique est NADPH- et O₂-dépendant (OMURA et SATO, 1964a,b). Les activités caféine déméthylase réalisées à partir de fractions microsomales de cellules hépatiques de l'homme adulte, varient de 183 ±114 à 819 ±110 pmoles.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines microsomales (GRANT et coll., 1987 ; BERTHOU et coll., 1989 ; AGÚNDEZ et coll., 1992). Ces activités ont été réalisées sur 1 mM de caféine, à une température de 37°C et un pH de 7,4 à 7,5.

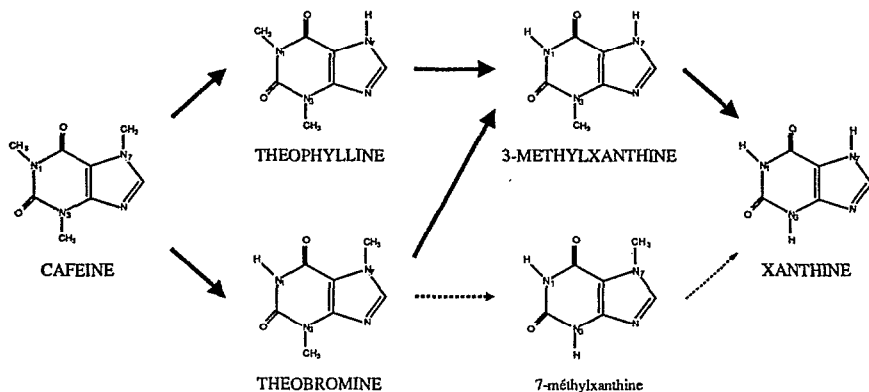
Le métabolisme de la caféine peut être modifié par de nombreux facteurs exogènes et endogènes. On citera l'effet compétitif de divers médicaments et des contraceptifs, l'effet inducteur de l'activité physique sur l'activité des CYP, ou encore l'effet inducteur de la consommation de végétaux riches en fer (comme le brocoli) sur les isoformes 1A2 (ARNAUD, 1993).

2.2.2.2. Chez *Coffea arabica*

Dans le caféier, la caféine est généralement considérée comme le produit final d'une chaîne de biosynthèse. Pourtant, plusieurs auteurs ont démontré dans cette plante, l'existence d'une voie de dégradation de la caféine, plus ou moins active selon les espèces et selon la partie de la plante considérée (BAUMANN et FRISCHKNECHT, 1988 ; SUZUKI et coll., 1992).

Le catabolisme de la caféine a été mis en évidence pour la première fois dans des feuilles de *Coffea arabica* par Kalberer, en 1965 (SUZUKI et WALLER, 1988). La dégradation est initialisée après la phase de développement des feuilles, puis s'accélère en fin de cycle. Inversement, la caféine est continuellement dégradée dans les fruits de *C. arabica*, quelque soit leur degré de maturité (SUZUKI et WALLER, 1984a,b). Néanmoins, cette activité catabolique reste beaucoup moins importante dans les fruits, que la production de caféine elle-même.

Les principaux intermédiaires cataboliques ont été identifiés chez *Coffea arabica* (SUZUKI et coll., 1992 ; WALLER et coll., 1993), ainsi que chez d'autres espèces appartenant au même genre (MAZZAFERA et coll., 1991 et 1994a). Des déméthylations successives conduisent à la formation de xanthine, *via* la théophylline, la théobromine et la 3-méthylxanthine. La xanthine suit par la suite, la voie classique de dégradation des purines. La figure 2.4 reprend le schéma du catabolisme de la caféine proposé par MAZZAFERA et coll. (1994a). Ces résultats ont été obtenus à partir d'essais réalisés *in vivo* sur des fruits matures ou non, mis en contact avec de la caféine radioactive. Aucun essai n'a été réalisé sur des extraits cellulaires, et les enzymes impliquées dans le mécanisme de déméthylation de la caféine chez *C. arabica* n'ont pas été identifiées.



Puis :

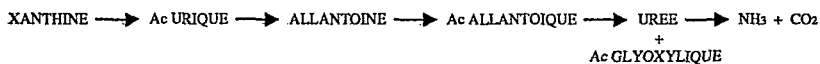


Figure 2.4 : Voie de dégradation de la caféine chez *Coffea* spp. (d'après MAZZAFERA et coll., 1994a).
Les flèches en pointillés correspondent à des transformations minoritaires.

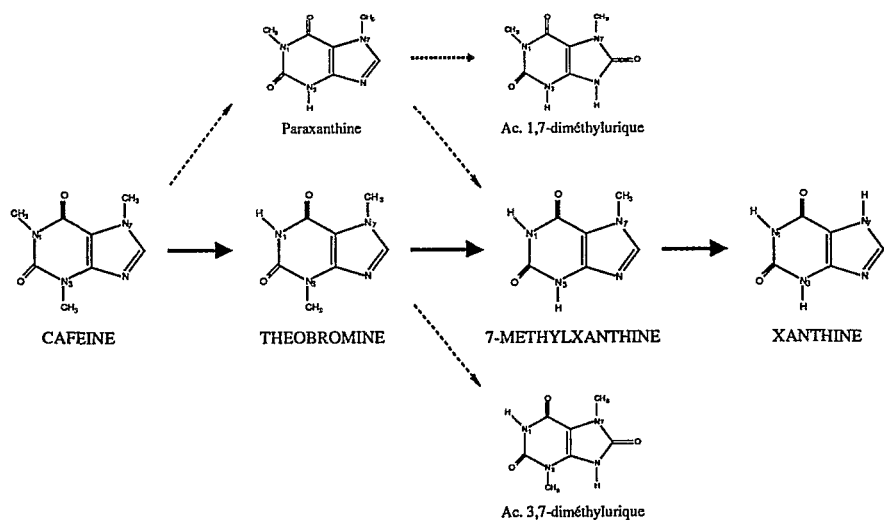
Les espèces les plus performantes à dégrader la caféine, comme *C. dewevrei*, présentent parallèlement les plus faibles vitesses de biosynthèse de l'alcaloïde. L'inverse est observé pour des espèces comme *C. arabica* ou *C. canephora*. Ce phénomène serait à l'origine des différences de teneurs en caféine entre les espèces du genre *Coffea* (BAUMANN et FRISCHKNECHT, 1988 ; MAZZAFERA et coll., 1991 et 1994a). La vitesse de dégradation de la caféine déterminée sur une culture de cellules en suspension de *C. arabica*, est de $75 \mu\text{g}\cdot\text{j}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ PMS de cellules (BAUMANN et FRISCHKNECHT, 1988).

2.2.2.3. Chez les bactéries

Toutes les bactéries citées dans la littérature comme étant capables de métaboliser la caféine, appartiennent au genre *Pseudomonas* ; exceptée une souche de *Bacillus coagulans*, isolée par KURTZMAN et SCHWIMMER (1971), se développant lentement et irrégulièrement. Mise à part l'étude de FRANKE et HAHN (1955) sur une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, tous les travaux entrepris ont été réalisés sur différentes souches de *Pseudomonas putida* isolées du sol (WOOLFOLK, 1975 ; BLECHER et LINGENS, 1977 ; ASANO et coll., 1993). Cependant, cette propriété n'est pas commune à toutes les bactéries appartenant à l'espèce *Ps. putida*, comme l'ont démontré BLECHER et LINGENS (1977) à partir de souches de collection.

Toutes les souches de *Ps. putida* dégradant la caféine, peuvent l'utiliser comme unique source d'azote et de carbone. Par contre, ces bactéries ne résistent pas de façon identique aux effets toxiques de cet alcaloïde. La souche étudiée par BLECHER et LINGENS (1977), puis par HOHNLOSER et coll. (1980) est inhibée à une concentration en caféine de $5,5 \text{ g.l}^{-1}$, alors que la souche isolée par GLÜCK et LINGENS (1987 et 1988) peut se développer jusqu'à 20 g.l^{-1} de caféine.

Les intermédiaires du métabolisme de la caféine chez *Ps putida*, ont été identifiés par BLECHER et LINGENS (1977) dans les surnageants de culture sur caféine ou sur d'autres méthylxanthines (Figure 2.5). Les principaux premiers intermédiaires sont : la théobromine, la 7-méthylxanthine et la xanthine. Ils ont été confirmés par la suite par différents auteurs (HOHNLOSER et coll., 1980 ; GLÜCK et LINGENS, 1987 ; ASANO et coll., 1993).



Puis :

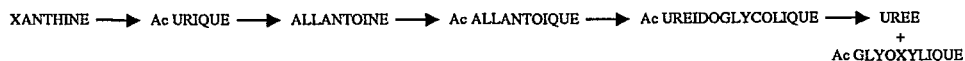


Figure 2.5 : Voie de dégradation de la caféine chez *Pseudomonas putida* (d'après BLECHER et LINGENS, 1977). Les flèches en pointillés correspondent à des transformations mineures.

Selon WOOLFOLK (1975), la déméthylation successive de la caféine en xanthine s'appuierait sur un mécanisme d'hydrolyse conduisant à la formation de méthanol. Ce mécanisme a été infirmé par les travaux de BLECHER et LINGENS (1977) qui ont démontré que la dégradation de la caféine en xanthine est réalisée par réactions de *N*-déméthylations oxydatives, conduisant à la formation de formaldéhyde. Une formaldéhyde déshydrogénase a été purifiée et caractérisée par HOHNLOSER et coll. (1980).

Les enzymes impliquées dans le mécanisme de dégradation de la caféine sont inductibles uniquement par les différents métabolites méthylés de la voie de dégradation de la caféine (BLECHER et LINGENS, 1977 ; ASANO et coll., 1993). L'addition de benzimidazole au milieu de culture inhibe la dégradation de l'alcaloïde par *Ps. putida* C1 (BLECHER et LINGENS, 1977). L'addition de fer stimule la dégradation complète de la caféine par *Ps. putida* No.352, alors que celle de zinc bloque la voie métabolique au niveau de la théobromine, entraînant une accumulation de ce métabolite (ASANO et coll., 1993). Dans des conditions optimales (sans zinc), cette bactérie dégrade 6 g.l⁻¹ de caféine en 24 h. (soit une vitesse moyenne de dégradation de 250 mg.l⁻¹.h⁻¹).

L'activité déméthylasique étudiée *in vitro* chez différentes souches de *Ps. putida*, se révèle être cytoplasmique, et dépendante de la présence d'oxygène et d'un cofacteur réduit : le NADH voire le NADPH (HOHNLOSER et coll., 1980 ; GLÜCK et LINGENS, 1988 ; ASANO et coll., 1994). Quelques caractéristiques de ces activités enzymatiques sont résumées dans le tableau 2.7.

Tableau 2.7 : Caractéristiques des activités déméthylases chez *Pseudomonas putida*.

Matériel	Substrat et cofacteurs	Principaux produits	Optima	Activateurs	Inhibiteurs	Effet neutre	Divers	Réf. Biblio.
Extrait intracellulaire brut de <i>Ps. putida</i> C1	CAF NAD(P)H, O ₂	THB (rarement 7MX) HCOH	pH ≈ 6,0 22-24°C	Co ²⁺		Mg ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Sn ²⁺	- Activité enzymatique : 14,3 à 33,3 nmoles caféine déméthylées.min ⁻¹ .mg ⁻¹ prot	HOHNLOSER et coll. (1980)
Extrait intracellulaire brut de <i>Ps. putida</i> WS	7MX NAD(P)H, O ₂	XAN HCOH	pH = 7,3 30-35°C	Mg ²⁺ , Ca ²⁺	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ag ⁺ , Hg ²⁺ , (Co ²⁺ , Fe ²⁺)	Toutes les autres méthyl-xanthines. EDTA	- Instable : perte de 94 % d'activité à 4°C/24 h ; - inactivée à 45°C/1 min. - Stabilisée par : glycérol, BSA, DTT, DTET, 7MX. - Pas de CYP	GLÜCK et LINGENS (1988)
Extrait intracellulaire brut de <i>Ps. putida</i> No. 352	CAF NADH, O ₂	THB HCOH				Zn ²⁺		ASANO et coll. (1994)
Théobromine déméthylase purifiée (mono-oxygénase)	THB NADH, O ₂	7MX HCOH			Zn ²⁺		- K _M = 1,1 mM (THB) - PM : 250 kDa (6 sous-unités de 41 kDa) - Présence probable de Fer	

CAF : caféine, THB : théobromine, 7MX : 7-méthylxanthine, XAN : xanthine, HCOH : formaldéhyde, NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphatée ou non) forme réduite, EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique, BSA : bovine serum albumin, DTT : dithiothréitol, DTET : dithioérythritol, CYP : cytochrome P-450.

HOHNLOSER et coll. (1980), puis GLÜCK et LINGENS (1988) n'ont mis en évidence que les activités caféine et 7-méthylxanthine déméthylases respectivement. Par contre, ASANO et coll. (1994) ont mis en évidence les activités caféine, théobromine et 7-méthylxanthine déméthylases à partir d'un extrait intracellulaire brut ou partiellement purifié de *Ps. putida* No.352.

Enfin, ASANO et coll. (1994) ont été les premiers à purifier une déméthylase, responsable de la dégradation de la théobromine en 7-méthylxanthine. Ces auteurs ont ainsi démontré que chez *Ps. putida*, différentes enzymes sont impliquées à chaque étape de déméthylation de la caféine ; confirmant ainsi l'hypothèse émise par GLÜCK et LINGENS (1988).

2.2.2.4. Chez les champignons filamenteux

L'étude biochimique du catabolisme de la caféine chez des champignons filamenteux n'a pas fait l'objet de nombreux travaux. Par contre, plusieurs études ont porté sur la décaféination de la pulpe de café par voie biologique, et notamment sur la sélection de souches de champignons aptes à éliminer cet alcaloïde contenu dans ce sous-produit (paragraphe 2.3.3.). Sans être *a priori* exceptionnelle, cette propriété n'est donc pas commune à un grand nombre de souches fongiques.

La plupart des champignons filamenteux étudiés pour leur capacité à dégrader la caféine, appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Seuls KURTZMAN et SCHWIMMER (1971) ont isolé de l'air, une souche de *Stemphylium*, ainsi qu'une souche de *Penicillium roquefortii* aptes à dégrader la caféine, la théobromine et la xanthine. La souche de *P. roquefortii* s'est révélée légèrement plus performante que celle de *Stemphylium* et a fait l'objet d'une étude plus détaillée par la suite (SCHWIMMER et coll., 1971).

La caféine peut être utilisée comme unique source d'azote par les champignons qui la dégradent, mais la possibilité de l'utiliser simultanément comme sources de carbone et d'azote n'a jamais été mentionnée (INA, 1971 ; KURTZMAN et SCHWIMMER, 1971 ; SCHWIMMER et coll., 1971). Toutefois, une souche de *Penicillium crustosum* dégrade la caféine contenue dans une infusion de café en absence de source exogène de carbone, mais beaucoup plus lentement qu'en présence de saccharose ou de glucose (SCHWIMMER et KURTZMAN, 1972). De même, plusieurs souches de *Penicillium* et d'*Aspergillus* dégradent la caféine de la pulpe de café, sans apport exogène de carbone ou d'azote (PERRAUD-GAIME, 1995).

INA (1971) a étudié une souche d'*Aspergillus niger* cultivée dans un milieu contenant 5 g.l⁻¹ de caféine, mais la culture du champignon et la dégradation de la caféine sont lentes. SCHWIMMER et coll. (1971) ont déterminé l'optimum de croissance pour leur souche de *P. roquefortii*, à 2 g.l⁻¹ de caféine initiale. Cette souche ne se développe plus pour une concentration de 20 g.l⁻¹ de caféine (KURTZMAN et SCHWIMMER, 1971). Les vitesses maximales de dégradation de la caféine sont comprises entre 11,7 mg.l⁻¹.h⁻¹ pour *P. crustosum* (SCHWIMMER et KURTZMAN, 1972) et 51,6 mg.l⁻¹.h⁻¹ pour *P. roquefortii* (KURTZMAN et SCHWIMMER, 1971), cultivés dans un milieu similaire à base de caféine (2 g.l⁻¹) et de saccharose (30 g.l⁻¹).

La théophylline est le premier produit de dégradation de la caféine chez *P. roquefortii* (SCHWIMMER et coll., 1971). Inversement, la théobromine et la 7-méthylxanthine n'apparaissent pas comme des intermédiaires potentiels chez cette souche. Chez *A. niger*, les principaux intermédiaires métaboliques retrouvés dans le surnageant de culture, sont la théophylline, la 3-méthylxanthine et la xanthine (INA, 1971). La figure 2.6 reprend le schéma du métabolisme de la caféine chez *Aspergillus niger*, proposé par INA (1971).

A notre connaissance, aucune étude du métabolisme de la caféine n'a été réalisée sur des extraits protéiques de champignons filamenteux, contrairement à celles menées sur la dégradation de la xanthine (SCAZZOCCHIO et DARLINGTON, 1968 ; ALLAM et ELZAINY, 1969). De même, aucune enzyme impliquée dans les mécanismes de déméthylation de la caféine n'a été identifiée ou purifiée. SAUER et coll. (1982) ont néanmoins montré que la fraction microsomale d'une souche de levure renfermait des cytochromes P-450 capables de démétyler la caféine, à raison de 61 pmoles.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines microsomales.

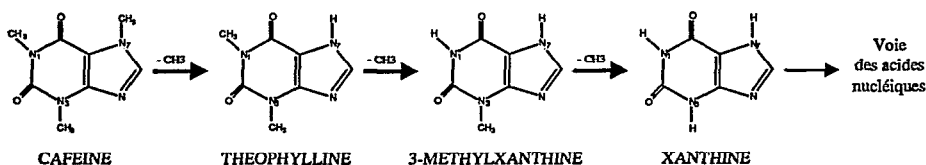


Figure 2.6 : Voie de dégradation de la caféine chez *Aspergillus niger* (d'après INA, 1971).

2.3. LES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

Après une rapide introduction sur les champignons filamenteux, nous présenterons quelques généralités concernant les *Aspergillus* et les *Penicillium*. L'origine, l'isolement et la description des principaux caractères des deux souches *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25, retenues pour la présente étude, seront également développés dans cette analyse bibliographique.

2.3.1. Généralités

Les champignons sont définis comme des organismes eucaryotes, sporogènes et non chlorophylliens, se reproduisant par voie sexuée ou asexuée (SMITH et BERRY, 1975 ; ALEXOPOULOS et MIMS, 1979). Le terme de "Champignons" regroupe principalement : les levures, les champignons filamenteux (communément appelés moisissures) et les champignons supérieurs (ou champignons comestibles).

Les champignons filamenteux sont des organismes pluricellulaires dont la structure somatique (ou végétative) présente, à de rares exceptions, une faible différenciation cellulaire. Cette structure somatique (mycélium ou thalle), est constituée de filaments (ou hyphes) formés d'une double membrane tubulaire. La membrane externe (ou paroi) assure la protection et la rigidité du mycélium. Le mycélium se développe par élongation des filaments à partir de leur extrémité (ou apex), riche en vésicules contenant des hydrolases et des synthétases. Ce mode de développement est appelé croissance apicale. En général, le cytoplasme des champignons filamenteux est multinucléé et renferme un certain nombre d'organites propres à toute cellule eucaryote comme les mitochondries, le réticulum endoplasmique,... (SMITH et BERRY, 1975 ; ALEXOPOULOS et MIMS, 1979).

Bien que la reproduction sexuée existe chez les champignons filamenteux, ces derniers se caractérisent principalement par un mode de reproduction asexuée. La fragmentation de cellules somatiques et la production de conidies (ou conidiospores) sont les deux principaux modes de reproduction asexuée. Les appareils reproducteurs sont issus d'une différenciation d'une partie du mycélium. Ils portent les conidies, cellules produites par divisions mitotiques spécifiques. Les conidies se caractérisent par une faible teneur en eau, une absence de mouvement cytoplasmique et une activité métabolique réduite. Placées dans des conditions favorables, les conidies se gonflent puis produisent un tube germinatif, base du futur mycélium : c'est l'étape de germination. En culture liquide agitée, les conidies plus ou moins germées, peuvent se regrouper en petits amas. Avec le développement du mycélium, chaque amas va donner naissance à une masse mycélienne dense et de forme sphérique, appelée pelote.

Les champignons filamenteux jouent un rôle important dans l'écologie terrestre de par leur caractère ubiquitaire et leur diversité. Ainsi, ils participent largement à la biodégradation des matières organiques du sol, de l'eau ou de l'air. Saprophytes, parasites ou symbiotes, les champignons peuvent aussi s'avérer pathogènes pour l'homme, les animaux, et les végétaux, en provoquant diverses mycoses ou en synthétisant des mycotoxines. Plusieurs espèces appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont particulièrement connues comme productrices de mycotoxines (RAPER ET FENNELL, 1965 ; PITT, 1979 ; ONIONS et coll., 1981). Les champignons filamenteux sont cependant utilisés dans de nombreux procédés biotechnologiques allant de la production d'aliments fermentés à celle de molécules à haute valeur ajoutée. Ce dernier point est développé au paragraphe 2.3.2.3.

Les champignons filamenteux sont, pour la plupart, des microorganismes aérobies stricts, acido-tolérants et leurs températures optimales de croissance sont comprises entre 20 et 35°C. (AINSWORTH et SUSSMAN, 1965 ; SMITH et BERRY, 1975 ; ONIONS et coll., 1981). Ce sont des microorganismes peu exigeants. Ils peuvent assimiler une large gamme de composés organiques carbonés et azotés grâce notamment à leurs nombreuses enzymes extracellulaires. Ils sont capables de synthétiser leurs propres vitamines mais sont *a contrario* exigeants en oligoéléments. Les nutriments sont véhiculés dans tous les compartiments du mycélium (mécanisme de translocation). Enfin, les champignons filamenteux se caractérisent par leur aptitude à se développer sur des milieux à faible activité de l'eau, jusqu'à $a_w = 0,65$ pour des espèces dites xérophiles (ORIOLE et coll., 1988 ; KOZAKIEWICZ et SMITH, 1994). Toutes ces propriétés font des champignons filamenteux les microorganismes les mieux adaptés à tout type de conditions de culture, en particulier pour les cultures en milieu solide (RAIMBAULT, 1980).

2.3.2. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium*

2.3.2.1. Classification

La taxonomie des champignons filamenteux est une science en évolution permanente, faisant appel le plus souvent à des critères descriptifs. Pour cette raison, elle a donné lieu à de nombreuses classifications, plus ou moins complexes et parfois divergentes (AINSWORTH et coll., 1973 ; ALEXOPOULOS et MIMS, 1979 ; DOMSCH et coll., 1980 ; BOTTON et coll., 1985).

Nous citerons les travaux d'ALEXOPOULOS et MIMS (1979), qui situent les deux genres *Aspergillus* et *Penicillium* dans la famille des EUROTIAACEAE, selon le schéma suivant :

Règne : MYCETEAE
Division : AMASTIGOMYCOTA
Sous-division : ASCOMYCOTINA
Classe : ASCOMYCETES
Sous-classe : PLECTOMYCETIDAE
Ordre : EUROTIALES
Famille : EUROTIAACEAE

Un schéma très similaire a été proposé par AINSWORTH et coll. (1973). Cependant, d'autres auteurs situent ces deux genres dans la classe des DEUTEROMYCETES ou champignons imparfaits (BOTTON et coll., 1985). Celle-ci regroupe les microorganismes qui ne possèdent pas de reproduction sexuée, ou qui se rencontrent le plus souvent sous leur forme imparfaite (se multipliant au moyen de conidies), bien qu'ils soient capables de développer un type de reproduction sexuée. Dans leur ouvrage, ALEXOPOULOS et MIMS (1979) n'avaient d'ailleurs pas écarté la possibilité d'attribuer les genres *Aspergillus* et *Penicillium* à la classe des DEUTEROMYCETES, sous-classe des HYPHOMYCETIDAE, ordre des MONILIALES, famille des MONILIAACEAE.

2.3.2.2. Caractéristiques morphologiques

Le genre *Aspergillus* est caractérisé par un mycélium septé, ramifié, incolore et brillant. Chez certaines espèces, il peut devenir partiellement coloré. L'appareil reproducteur (conidiophore) se développe à partir d'une cellule différenciée (la cellule pied). Le conidiophore est non ramifié, septé ou non, et d'une longueur variable. Il produit à son extrémité une vésicule de forme sphérique ou allongée. Cette vésicule porte une ou deux séries superposées de cellules (sterigmata). Les sterigmata qui produisent les conidies sont appelées phialides. Elles se distinguent par leur aspect en forme de quille ou de bouteille. Les conidies ont des tailles, des formes et des couleurs très variables. L'arrangement dans l'espace des chaînes de conidies et la disposition des sterigmata sur la vésicule déterminent l'aspect général de la "tête aspergillaire". Cette dernière peut apparaître globulaire, radiée voire cylindrique (RAPER et FENNELL, 1965). Une illustration de ces caractéristiques morphologiques est donnée dans la figure 2.7-A.

Le genre *Penicillium* est caractérisé par un mycélium septé et ramifié. La base non ramifiée des conidiophores correspond au stipe. Les conidiophores septés ou non, peuvent être ramifiés (ou verticillés) jusqu'à trois fois de manière symétrique ou non. Leurs extrémités sont porteuses de plusieurs phialides, généralement en forme de quille ou de bouteille. Comme chez les *Aspergillus*, les phialides sont les cellules reproductrices, porteuses de conidies arrangées en chaînettes. Les conidies de *Penicillium* sont généralement lisses, rondes ou ovoïdes, presque toujours pigmentées en bleu ou en vert, pouvant virer au jaune (PITT, 1979). Une illustration de ces caractéristiques morphologiques est donnée dans la figure 2.7-B.

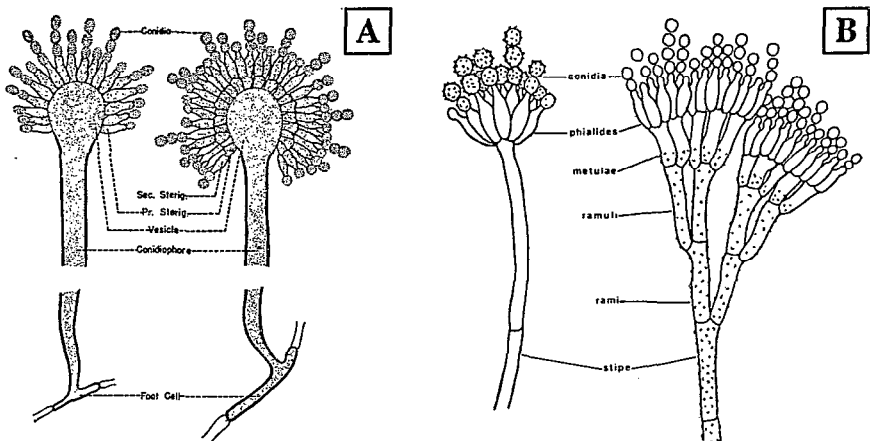


Figure 2.7 : Schémas des structures reproductrices des champignons filamenteux appartenant au genre *Aspergillus* (A) et au genre *Penicillium* (B).

2.3.2.3. Utilisation en biotechnologie

L'utilisation des genres *Aspergillus* et *Penicillium* pour la transformation de denrées alimentaires est très ancienne. Depuis, de nombreuses études systématiques entreprises sur ces microorganismes ont permis d'élargir leurs champs d'application dans les domaines de l'agro-alimentaire, de la pharmacologie et/ou de l'écologie. Cependant, ces deux genres de champignons filamenteux font également partie des contaminants fongiques les plus couramment rencontrés. Ils sont responsables de la biodétérioration de nombreux produits : aliments, mais aussi papier, caoutchouc, cuir, peinture, métaux,... (BOTTON et coll., 1985).

Tableau 2.8 : Principaux domaines d'application des champignons filamenteux appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*
(d'après SMITH et BERRY, 1975 ; BOTTON et coll., 1985 ; LARPENT-GOURGAUD et SANGIER, 1992 ; SMITH, 1994).

Domaines d'application	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>
Produits alimentaires	Produits orientaux (koji, miso, saké...)	Fromages (maturation) Saucissons (ferments de surface)
Biomasse (enrichissement en protéines)	Résidus agricoles amylacés, cellulosiques	Lactosérum Résidus cellulosiques
Biodégradation / Dépollution	Effluents cellulosiques, biolixiviation, hydrocarbures, polyuréthanes	Biolixiviation, hydrocarbures, polyuréthanes
Biotransformations : par les conidies par le mycélium	Hydroxylation de la progestérone par <i>A. ochraceus</i> action sur des acides aminés, des antibiotiques	Transformation de triglycérides en méthyl-cétones par <i>P. roquefortii</i> (production d'arômes) action sur des antibiotiques
Production d'acides organiques	Acides citrique, itaconique, gallique, gluconique, érythorbique, kojique	Acides gluconique, érythorbique
Production de lipides	A partir de sucres simples	A partir de sucres simples
Production de métabolites secondaires	Antibiotiques (ac. aspergillique, fumagilline) autres : anticholestérolémiant, inhibiteurs d'enzymes	Antibiotiques (pénicillines, amudol, griséofulvine) autres : analgésique, anticholestérolémiant, immunosuppresseurs
Production d'arômes	Alcools (du saké par <i>A. oryzae</i>)	Cétones (arôme du "bleu" par <i>P. roquefortii</i>)
Production d'enzymes	Enzymes amylolytiques, cellulases, glucose oxydase, catalase, protéases, pectinases, xylanases, lipases, tannase, uricase, anthocyanase, linamarase, naringinase	Glucose oxydase, dextranases, pectinases, cellulases, ribonucléases, linamarase
Production de protéines hétérologues	Chymosine de veau par <i>A. awamori</i>	

Les exemples d'applications faisant intervenir des champignons filamenteux appartenant aux genres *Aspergillus* ou *Penicillium* sont très nombreux. Ils ont été largement discutés par divers auteurs (SMITH et BERRY, 1975 ; ONIONS et coll., 1981 ; BOTTON et coll., 1985 ; LARPENT-GOURGAUD et SANGLIER, 1992 ; SMITH, 1994). Les principaux domaines d'application de ces microorganismes sont résumés dans le tableau 2.8.

A l'échelle industrielle, l'utilisation de ces champignons filamenteux reste encore limitée à quelques domaines (produits alimentaires traditionnels, production d'enzymes). Pourtant, ces microorganismes présentent une grande diversité et de nombreuses potentialités comme la possibilité de se développer en milieu solide ou en milieu liquide (surface ou submergé). Ainsi, les nombreuses études dont ils font l'objet, devraient permettre dans l'avenir une extension de leurs champs d'application.

2.3.3. *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25

2.3.3.1. Origine des souches

Comme nous l'avons souligné au paragraphe 2.2.2.4., plusieurs souches de champignons filamenteux appartenant essentiellement aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, ont été étudiées pour leur aptitude à dégrader la caféine, dans le but de trouver des alternatives biologiques aux méthodes classiques de décaféination.

Afin de décaféiner la pulpe de café par des microorganismes susceptibles d'être cultivés sur ce sous-produit agro-industriel, des chercheurs de l'ORSTOM et de l'Université Autonome Métropolitaine de Mexico ont sélectionné des souches de champignons filamenteux à partir d'échantillons prélevés sur les lieux de production et de premières transformations du café (AQUIAHUATL et coll., 1988 ; ROUSSOS et coll., 1989 ; AQUIAHUATL, 1992).

Près de 300 souches ont ainsi été isolées sur différents milieux de culture à base d'infusion de café (grains ou pulpe). Néanmoins, un criblage réalisé en milieu liquide à base de caféine comme unique source d'azote, a révélé que seules deux souches de *Penicillium* et six souches d'*Aspergillus* dégradaient efficacement la caféine à plus de 90 % (AQUIAHUATL et coll., 1988). Ces huit souches ont fait l'objet par la suite de différentes études physiologiques, notamment en culture solide sur de la pulpe de café (ROUSSOS et coll., 1989 ; ROUSSOS et coll., 1994 ; PERRAUD-GAIME, 1995).

Les principales caractéristiques de deux de ces microorganismes retenus pour la présente étude sont présentées dans le paragraphe suivant. Il s'agit des souches référencées *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25 qui avaient été sélectionnées lors de travaux préliminaires (DENIS, 1992). Les résultats de ces derniers travaux seront par ailleurs largement repris tout au long de ce mémoire.

2.3.3.2. Caractéristiques des souches

Le tableau 2.9 résume les caractéristiques physiologiques des champignons filamenteux présélectionnés pour leur forte capacité à dégrader la caféine (AQUIAHUATL et coll., 1988 ; ROUSSOS et coll., 1989 ; AQUIAHUATL, 1992). En particulier, la croissance apicale, le temps de germination des conidies, l'effet du pH initial du milieu sur la croissance et le taux de dégradation de la caféine, ont été décrits. Ces critères sont importants pour l'utilisation de champignons filamenteux dans le procédé de fermentation en milieu solide (ROUSSOS, 1985).

Plus récemment, PERRAUD-GAIME (1995) a décrit le comportement de ces mêmes champignons cultivés sur pulpe de café par fermentation en milieu solide (FMS). Il a été démontré que toutes ces souches sont capables de décaféiner ce substrat. L'évolution des principaux paramètres de croissance obtenus pour les souches *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25, est présentée dans la figure 2.8. Ces champignons sont capables de se développer sur la pulpe de café sans addition de sources de carbone ou d'azote exogènes. Dans ces conditions, *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25 dégradent la caféine à plus de 90 %, en moins de 30 heures.

Par ailleurs, la souche *Penicillium* V33A25, a fait l'objet de divers travaux plus spécifiques, toujours réalisés en FMS sur de la pulpe de café (ROUSSOS et coll., 1989 ; ROUSSOS et coll., 1994 ; PERRAUD-GAIME, 1995). Ainsi, lors de leur étude préliminaire, ROUSSOS et coll. (1989) ont démontré que ce microorganisme cultivé à l'échelle pilote sur un lot de pulpe de 20 kg, dégrade 73 % de la caféine présente, en 48 heures.

Par la suite, ROUSSOS et coll. (1994) ont étudié l'effet de l'addition de sulfate d'ammonium et/ou d'urée à la pulpe de café, sur la dégradation de la caféine par *Penicillium* V33A25. Les auteurs ont montré que l'apport de sulfate d'ammonium combiné ou non à celui d'urée, permet un meilleur développement du champignon, par rapport au témoin sans supplément azoté. Dans une moindre mesure, l'addition d'urée seule améliore également la croissance mycélienne. Par contre, la caféine n'est pas dégradée après 72 heures de culture dans tous les milieux supplémentés en azote, contrairement au témoin où l'alcaloïde est entièrement éliminé. Les auteurs ont conclu à une consommation préférentielle par *Penicillium* V33A25 des sources simples d'azote par rapport à la caféine, probablement liée à un phénomène de répression de la dégradation de l'alcaloïde par le sulfate d'ammonium et l'urée.

Enfin, PERRAUD-GAIME (1995) a optimisé les conditions de culture en FMS de *Penicillium* V33A25. Cet auteur a démontré qu'après 30 heures de fermentation, la caféine est entièrement dégradée à une température d'incubation de 25°C, alors qu'à une température de 35°C, elle n'est pas dégradée. D'autre part, les paramètres suivants n'influencent pas significativement la vitesse de dégradation de la caféine : stérilisation préalable de la pulpe, pH initial compris entre 4,4 et 5,6, ajout de chlorure de calcium compris entre 0,1 et 0,3 g.l⁻¹, addition de sels de phosphate et de magnésium, débit d'air compris entre 40 et 70 ml.min⁻¹ par colonne, éclairage des cultures.

Tableau 2.9 : Caractérisation physiologique de huit souches de champignons filamenteux aptes à dégrader la caféine (d'après ROUSSOS et coll., 1989).

Souches	Croissance apicale (mm.j ⁻¹) ^a		Temps de germination (h.) ^b		Effet du pH initial sur la croissance ^{b,c}			% Dégradation de la caféine ^b après 4 jours à 25°C
	25°C	35°C	25°C	35°C	2,0	3,0	4,8	
<i>Penicillium</i> V33A25	3,4	2,4	11 h 30	12 h 30	-	+	+	90
<i>Penicillium</i> V26A25	3,6	2,6	12 h 00	12 h 30	-	+	+	98
<i>Aspergillus</i> C23B25	5,3	7,7	11 h 30	09 h 00	nd	nd	nd	92
<i>Aspergillus</i> C11B25	3,8	7,4	11 h 00	09 h 00	nd	nd	nd	95
<i>Aspergillus</i> C28B25	4,6	7,4	11 h 15	09 h 00	nd	nd	nd	98
<i>Aspergillus</i> C16A25	5,8	7,0	11 h 00	09 h 00	nd	nd	nd	99
<i>Aspergillus</i> V12A25	5,8	6,2	10 h 30	08 h 00	-	+	+	100
<i>Aspergillus</i> C17B25	5,5	6,2	11 h 15	09 h 00	nd	nd	nd	100

^a Résultats obtenus sur milieu gélosé Potato Dextrose Agar

^b Résultats obtenus en milieu liquide à base de caféine et de saccharose

^c (-) pas de croissance ; (+) croissance ; (nd) non déterminé

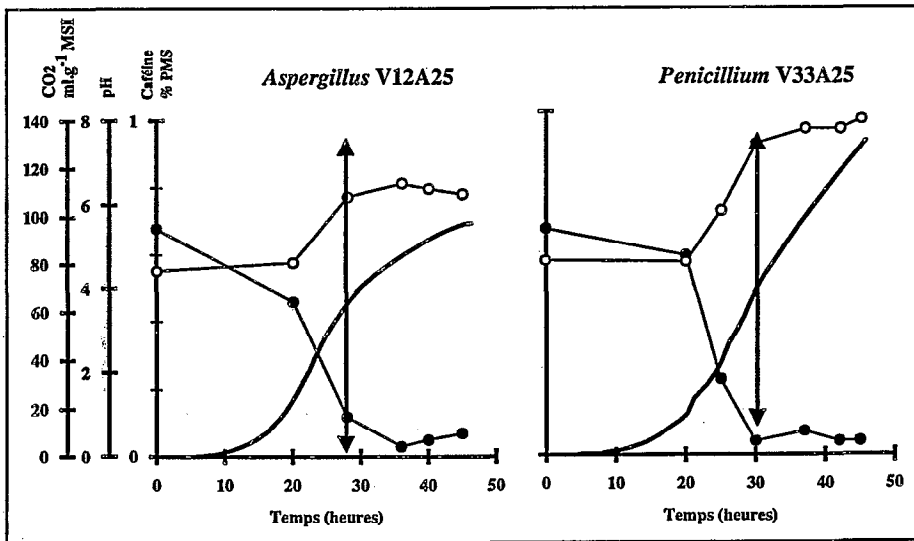


Figure 2.8 : Cultures d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 par Fermentation en Milieu Solide sur de la pulpe de café, à 25°C (d'après PERRAUD-GAIME, 1995).

Evolutions de la production de CO₂ (—○—), de la teneur en caféine (●) et du pH (○). Début de la sporulation (↔) (MSI : matière sèche initiale ; PMS : poids de matière sèche).

2.4. CONCLUSION

Cette analyse bibliographique nous a permis dans un premier temps de rassembler toutes les informations concernant la caféine. Cette molécule naturellement produite par une soixantaine de végétaux dont le caféier et le thé, est un alcaloïde dérivé de la xanthine. Ses caractéristiques physico-chimiques sont bien définies. Enfin, il existe diverses méthodes de dosage de la caféine et de ses dérivés ; les principales étant basées sur la technique de chromatographie liquide haute performance.

La caféine est surtout connue pour ses propriétés stimulantes du système nerveux central. L'effet excitant qu'elle procure a d'ailleurs largement concouru au succès de boissons telles que le café, le thé ou les colas. Les incidences de l'absorption de caféine sur le comportement et la santé de l'homme sont connues, mais ses mécanismes d'action n'ont pas tous été élucidés. Néanmoins, on reconnaît aujourd'hui que la consommation modérée de caféine est sans réel danger pour l'homme. A l'inverse, la caféine présente des effets mutagènes sur les microorganismes, et ses effets néfastes sur la croissance des animaux d'élevage ont été résumés par PERRAUD-GAIME (1995).

Le métabolisme de la caféine fait également l'objet de nombreuses études. Les principaux intermédiaires des voies de biosynthèse de la caféine chez le caféier et le thé, ou de sa biodégradation chez ces mêmes végétaux et chez les êtres supérieurs sont identifiés. Les systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme de la caféine chez les plantes est encore peu étudié, à l'inverse de ceux des êtres supérieurs où plusieurs isoformes de cytochromes P-450 ont été reconnues comme responsables de la biotransformation de la caféine.

Des voies de biodégradation de la caféine ont également été mises en évidence chez quelques souches bactériennes (*Pseudomonas putida*) et fongiques (*Aspergillus* et *Penicillium*). Sans être exceptionnelle, cette caractéristique n'est pas répandue chez les microorganismes. Peu d'études physiologiques et de rares études biochimiques ont été réalisées sur ce sujet, en particulier chez les champignons filamenteux.

Il ressort cependant de l'analyse bibliographique que chaque espèce vivante utilise un système enzymatique propre pour transformer la caféine, car les intermédiaires méthylés issus des N-déméthylations de l'alcaloïde sont différents d'une espèce à une autre.

L'étude que nous proposons de réaliser contribuera à apporter de nouvelles connaissances dans le domaine du métabolisme de la caféine par des champignons filamenteux, en précisant notamment les différents métabolites produits par les deux souches sélectionnées. La mise au point d'une méthode analytique pour mesurer l'activité caféine déméthylase chez ces microorganismes revêtira également un caractère original et inédit sur ce thème.

MATERIEL ET METHODES

3. MATERIEL ET METHODES

Le matériel et les méthodes présentés dans ce chapitre ont été élaborés à partir de données bibliographiques, et font état des techniques analytiques et autres conditions opératoires mises au point lors de ces travaux de thèse. Nous présenterons plus précisément les microorganismes et toutes les conditions de culture qui ont permis d'étudier leur métabolisme *in vivo* comme *in vitro*.

3.1. MICROORGANISMES

Les deux souches de champignons filamenteux utilisées au cours de cette étude, appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Elles font partie de la collection du laboratoire de Biotechnologie de l'ORSTOM, où elles sont référencées V12A25 et V33A25 respectivement. Dans les tableaux et les figures de ce mémoire, ces souches seront désignées par "A12" pour *Aspergillus* V12A25 et "P33" pour *Penicillium* V33A25.

3.2. MILIEUX DE CULTURE

La composition des milieux de culture ainsi que certaines particularités de leur préparation sont reportées en annexe 1.

3.2.1. Pour l'étude morphologique

Trois milieux de culture sont utilisés pour la description des caractéristiques morphologiques des champignons filamenteux. Il s'agit des milieux :

- Malt Extract Agar (MEA)
- Czapek-Dox (CD)
- Czapek Yeast Agar (CYA)

Pour l'étude des deux caractéristiques physiologiques que sont la croissance apicale et l'indice de sporulation, les milieux gélosés suivants sont utilisés :

- | | |
|------------------------------|-------------------------------|
| - Malt Extract Agar (MEA) | - Café Moulu-Saccharose (CMS) |
| - Czapek Yeast Agar (CYA) | - Caféine-Saccharose (CS) |
| - Potato Dextrose Agar (PDA) | - Caféine-Glucose (CG) |

3.2.2. Pour la conservation et la production de conidies

Les microorganismes sont conservés plusieurs années sous forme de conidies lyophilisées, contenues dans des ampoules de verre scellées sous vide et maintenues à +4°C. Il a été vérifié que la lyophilisation n'altère pas les caractéristiques des deux champignons.

Ces souches sont également conservées à plus court terme dans des "piluliers" (flacons à vis de 15 ml) sur le milieu Café Moulu-Saccharose (CMS). Après ensemencement en surface suivi d'une période d'incubation de 7 jours à 25°C pour *Penicillium* V33A25 ou à 30°C pour *Aspergillus* V12A25, ces piluliers sont stockés à +4°C.

Après la mise en suspension des conidies à l'aide d'eau distillée additionnée de Tween 80 à 0,2 % (tensioactif améliorant la dispersion des conidies), les souches subissent une régénération par deux repiquages successifs sur milieu CMS comme indiqué dans la figure 3.1.

3.2.3. Pour la culture en fioles d'Erlenmeyer

3.2.3.1. Milieu de base Caféine-Saccharose (CS)

Le milieu de culture de base Caféine-Saccharose (CS) est entièrement synthétique. Le rapport C/N est de 50. Sa composition par litre d'eau distillée, est la suivante :

Caféine anhydre (source d'azote)	1,00 g
Saccharose (source de carbone)	29,40 g
KH ₂ PO ₄	1,30 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,12 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,30 g
pH (corrigé par H ₂ SO ₄)	4,00
Solution d'oligoéléments*	10 ml

Stérilisation : 15 min - 121°C

* La solution d'oligoéléments est ajoutée au milieu de culture stérile, lors de l'inoculation. Sa composition par litre d'eau milliQ, est la suivante : FeSO₄.7H₂O : 3 g, ZnSO₄.7H₂O : 2,2 g, MnSO₄.H₂O : 1,54 g, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O : 370 mg, CaCl₂.2H₂O : 200 mg, CuSO₄ : 100 mg, CoCl₂.6H₂O : 40 mg. Cette solution préparée en conditions stériles est conservée à +4°C. L'apport d'azote par le (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O est considéré comme négligeable.

3.2.3.2. Autres milieux

D'autres milieux de culture dérivés du milieu de base sont également utilisés :

- Caféine-Glucose (CG) ; le saccharose est remplacé par le glucose à 29,7 g.l⁻¹ (concentration calculée pour respecter un rapport C/N de 50),
- Caféine-Saccharose Urée (CS+U) ; de l'urée est ajoutée à différentes concentrations,
- Caféine-Saccharose Ammonium (CS+A) ; du sulfate d'ammonium est ajouté à différentes concentrations.

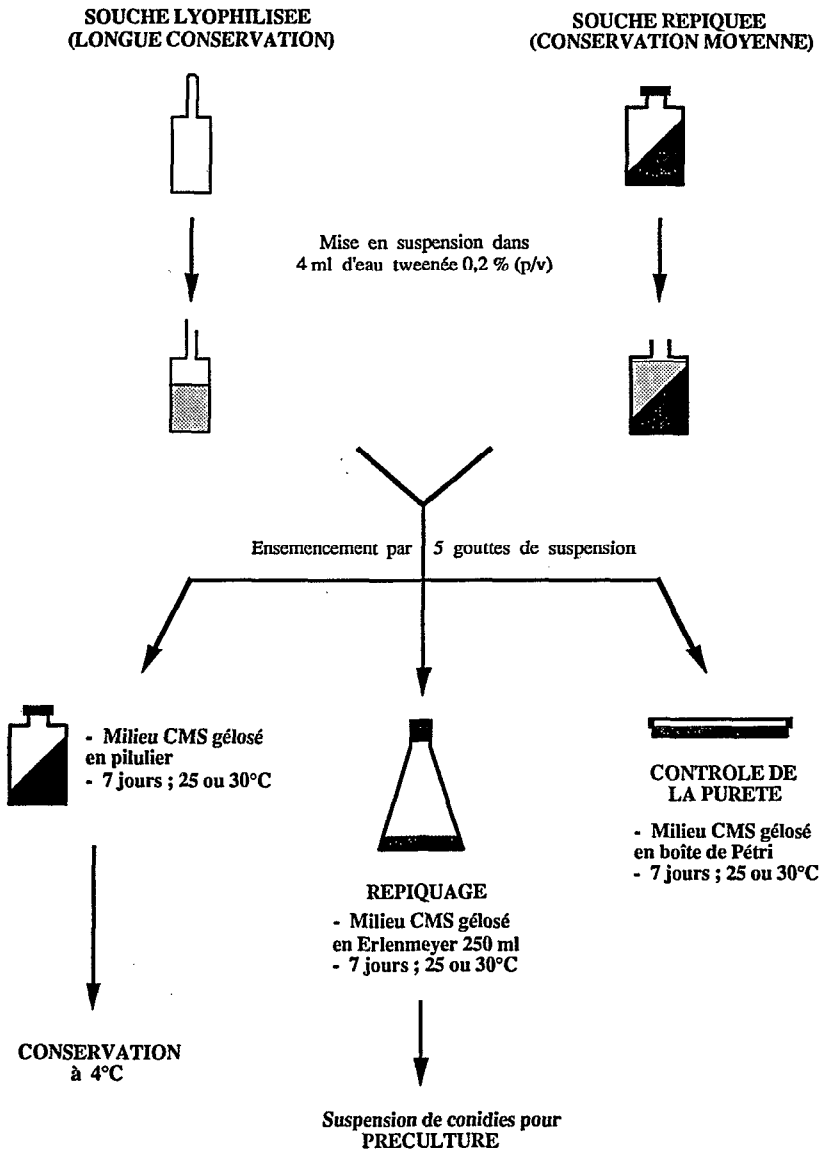


Figure 3.1 : Protocole de régénération d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 cultivées sur milieu gélifié à base de Café Moulu et de Saccharose (CMS).

3.3. CONDITIONS DE CULTURE

3.3.1. Préculture et préparation d'une suspension de conidies

Tous les milieux de préculture et de culture sont ensemencés à partir de suspensions de conidies obtenues en surface sur milieux gélosés, comme décrit dans le protocole figure 3.2.

Sauf cas particulier, le milieu de préculture est le milieu Café Moulu-Saccharose, conditionné en fioles d'Erlenmeyer de 250 ml, à raison de 25 ml de milieu par fiole. Il est ensemencé en masse au taux de 4.10^5 conidies.ml⁻¹ et incubé 7 jours à 25 et 30°C pour *Penicillium* V33A25 et *Aspergillus* V12A25 respectivement. Pour cette dernière souche, deux fioles sont utilisées pour la production d'un inoculum.

3.3.2. Etude morphologique sur milieux gélosés

3.3.2.1. Milieux d'identification

Les milieux d'identification MEA, CD et CYA sont répartis en boîtes de Pétri. Ces milieux sont ensemencés par dépôt en surface d'une à trois gouttes de suspension de conidies obtenues sur les mêmes milieux. Les boîtes sont incubées 7 jours à 25°C.

3.3.2.2. Etude de la croissance apicale

Les milieux MEA, CYA ou PDA sont conditionnés en boîtes de Pétri. Ces milieux sont ensemencés par dépôt en surface et au centre de la boîte d'une goutte de suspension de conidies d'environ 10^7 conidies.ml⁻¹. Les boîtes sont incubées 8 jours à 25°C.

3.3.2.3. Etude de l'indice de sporulation

Les milieux CMS, CS et CG sont conditionnés en fioles d'Erlenmeyer de 250 ml, à raison de 20 ml de milieu par fiole. Ces milieux sont ensemencés en masse à l'aide d'une suspension de conidies, au taux de 4.10^5 conidies.ml⁻¹. Les flacons sont incubés de 3 à 7 jours à 25°C.

3.3.3. Cultures en milieux liquides agités

Les cultures en milieux liquides sont réalisées en fioles d'Erlenmeyer de 500 ml cotonnées, contenant 100 ml de milieu. Les milieux sont ensemencés au taux de 10^6 conidies.ml⁻¹. Les fioles sont placées en incubateurs thermostatés rotatifs (150 rpm), à 25°C pour *Penicillium* V33A25 et à 30°C pour *Aspergillus* V12A25 (sauf exceptions).

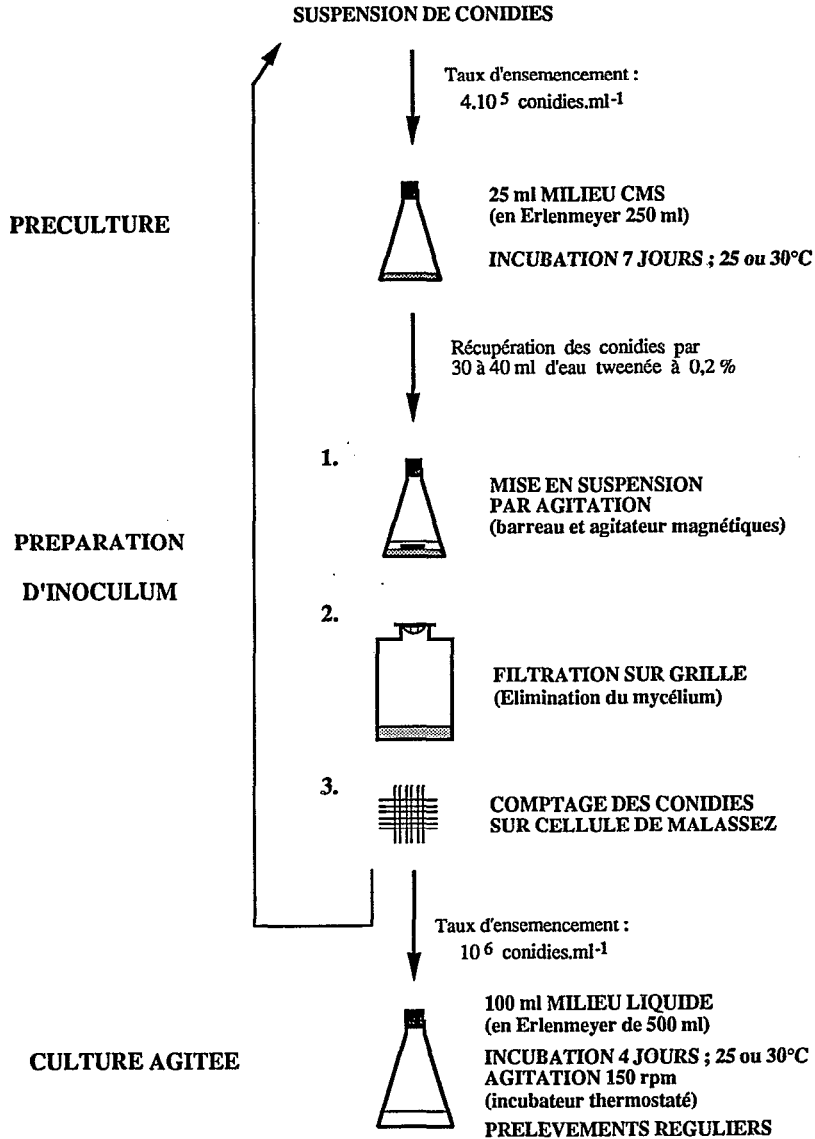


Figure 3.2 : Préparation de l'inoculum à base de conidies et mise en œuvre des cultures liquides pour la dégradation de la caféine.

3.3.4. Méthodologie des prélèvements

Lors de l'étude de la physiologie des souches cultivées en milieux liquides, des prélèvements de 2 à 4 ml sont réalisés en conditions stériles, à intervalles réguliers. Chaque échantillon est alors filtré soit sur membrane de porosité 0,45 µm dans le cas où une analyse de la biomasse est réalisée, soit sur filtre individuel de porosité 0,45 ou 0,22 µm, après élimination préalable du mycélium et/ou des conidies par centrifugation (5.000 g/10 min./20°C). Dans tous les cas, les filtrats sont stockés à -20°C avant analyses.

Parallèlement, des prélèvements sont effectués pour la description morphologique des souches afin de vérifier l'absence de contaminants, la bonne germination des conidies, l'évolution du mycélium et l'apparition d'une éventuelle conidiogenèse.

3.4. CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES - IDENTIFICATION DES SOUCHES

3.4.1. Description des colonies sur milieux d'identification

3.4.1.1. Etude macroscopique

Les colonies des champignons filamenteux sont observées à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire (OLYMPUS SHZ). Les principaux caractères décrits sont les suivants : diamètre, régularité des bords et de la surface, intensité de la conidiogenèse, couleurs en surface et au dos de la boîte, présence ou non de sécrétions, perception d'une odeur.

3.4.1.2. Etude microscopique

A partir d'une culture sur milieu gélosé Czapek-Dox, un carré de colonie (5x5 mm) est découpé à l'aide d'un scalpel, puis placé entre lame et lamelle dans quelques gouttes d'eau additionnée de Tween 80 à 0,2 %. Les observations microscopiques sont réalisées à l'aide d'un microscope optique (OLYMPUS BH-Z), à des grossissements de 100, 400 ou 1000 suivant les structures fongiques étudiées. La taille de ces structures est mesurée à l'aide d'un micromètre (OLYMPUS CT x 10).

3.4.1.3. Clés d'identification

L'identification des deux champignons filamenteux est réalisée à l'aide des clés dichotomiques établies par PITT (1979) pour le genre *Penicillium* et par RAPER et FENNELL (1965) pour le genre *Aspergillus*. Ces clés d'identification sont présentées en annexe 2.

3.4.2. Mesure de la croissance apicale

La croissance apicale correspond à la vitesse d'élongation du mycélium, cultivé sur une surface solide plane. Cette élongation est mesurée chaque jour à l'aide d'une règle graduée. La croissance apicale est exprimée en millimètres par jour.

3.4.3. Mesure de l'indice de sporulation

L'indice de sporulation correspond au nombre total de conidies produites à la surface d'un milieu de culture gélosé, rapporté à l'unité de surface occupée par le milieu. La surface occupée par 20 ml de milieu dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 ml est de 50 cm². Les conidies sont récupérées puis comptées comme décrit dans le protocole de la figure 3.2 (paragraphe 3.3.1.). L'indice de sporulation est exprimé en nombre de conidies produites par centimètre carré.

3.5. ESTIMATION DE LA BIOMASSE ET ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

3.5.1. Estimation de la biomasse

La méthode utilisée pour estimer la biomasse produite dans un milieu de culture liquide est identique à celle décrite par DENIS (1992). La biomasse correspond à la masse de mycélium et/ou de conidies retenus sur une membrane filtrante Gelmann SUPOR 450 - 0,45 µm. Elle est exprimée en gramme (poids sec) par litre de milieu cultivé.

3.5.2. Dosage des sucres

Le dosage du saccharose est réalisé par une méthode colorimétrique développée par DUBOIS et coll. (1956). Cette méthode permet de déterminer la concentration des sucres totaux à l'aide d'un réactif à l'anthrone ; le glucose servant d'étalon.

Le dosage du glucose est réalisé par une méthode de Chromatographie Liquide Haute Performance couramment utilisée au laboratoire et décrite par PERRAUD-GAIME (1995).

3.5.3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé à l'aide du kit *Protein Assay* (BIORAD - Réf. 500311). Il s'agit d'une méthode colorimétrique simple, rapide et sensible ; basée sur la méthode de BRADFORD (1976). La BSA est utilisée comme étalon.

3.5.4. Dosage de l'urée et du sulfate d'ammonium

Le dosage simultané de l'urée et du sulfate d'ammonium est réalisé à l'aide d'un kit enzymatique BOEHRINGER MANNHEIM (Réf. 542946).

3.5.5. Mesure du pH

La mesure du pH est réalisée à l'aide d'un pH-mètre KNICK muni d'une électrode combinée INGOLD. L'étalonnage de l'appareil est réalisé à 25°C à l'aide de solutions tampon.

3.6. ANALYSE DE LA CAFEINE ET DES METHYLYXANTHINES

3.6.1. Traitement des échantillons

3.6.1.1. Pour l'analyse quantitative par CLHP

- Dans le cas de l'analyse quantitative des méthylxanthines présentes dans les surnageants de cultures, les échantillons sont préparés à partir des filtrats conservés à -20°C (paragraphe 3.3.4.). Ceux-ci sont dilués dans de l'eau milliQ, de manière à obtenir des concentrations en méthylxanthines inférieures à 20 mg.l⁻¹. Un étalon interne (8-hydroxyéthylthéophylline) est ajouté aux échantillons, à raison de 10 mg.l⁻¹ en concentration finale.

- Dans le cas de l'analyse quantitative des essais enzymatiques réalisés sur des extraits protéiques d'*Aspergillus* V12A25, une extraction de la caféine et des méthylxanthines est réalisée dans des tubes à hémolyse en verre, selon le protocole suivant :

- 0,5 ml d'échantillon + 1 ml de chloroforme/isopropanol (85:15 ; v/v)
- Agiter au vortex à vitesse maximale pendant 30 secondes
- Récupérer la phase organique (phase inférieure) dans un second tube
- Seconde extraction dans les mêmes conditions sur la phase aqueuse
- Récupérer la phase organique et mélanger à la première
- Evaporer le solvant à l'étuve à 105°C
- Reprendre l'extrait sec par 1 ml d'eau milliQ puis traiter dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus (cas d'un filtrat de surnageant de culture)

3.6.1.2. Pour l'analyse qualitative par CCM ou par CLHP

Cette analyse est réalisée sur des échantillons issus d'essais enzymatiques. Une extraction des méthylxanthines est réalisée suivant le protocole décrit précédemment. L'extrait sec est repris :

- soit par 50 µl du même solvant d'extraction, avant dépôt sur plaque de CCM;
- soit par 1 ml d'eau milliQ, puis directement analysé en CLHP. La sensibilité du détecteur est augmentée pour mieux visualiser les méthylxanthines.

3.6.2. Analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

3.6.2.1. Matériel

Le matériel utilisé pour l'analyse des méthylxanthines par CCM est le suivant :

- Plaques chromatographiques MERCK : Gel de Silice 60 F₂₅₄ (Réf. 1.05554)
- Micropipettes de verre calibrées (10 ou 20 µl)
- Cuve de migration en verre, de dimensions : 21x21x8 cm.

3.6.2.2. Conditions opératoires standards

Environ 200 ml de solvant de migration (chloroforme/méthanol/isopropanol 90:8:7 v/v/v) sont préparés puis versés dans la cuve. Une feuille de papier Whatman n°1 (20x20 cm) est imbibée du solvant et plaquée contre l'une des parois de la cuve, afin de saturer correctement celle-ci par le solvant.

Avant de déposer les échantillons sur la plaque (21 au maximum), un trait servant de repère aux dépôts est préalablement tracé au crayon noir, à 2 cm du bas de la plaque.

Après 20 min. de migration, le front du solvant est rapidement repéré par un trait lorsque les distances de migration (Rf) des différents composés séparés doivent être déterminées (paragraphe 3.10.1.). La plaque est ensuite séchée à l'air libre. Toutes les méthylxanthines apparaissent sous forme de spots violets sur fond blanchâtre lorsque la plaque est observée sous lumière ultra-violette.

3.6.3. Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

3.6.3.1. Matériel

Le matériel utilisé pour l'analyse des méthylxanthines par CLHP est le suivant :

- Pompe : PHILIPS modèle PU 4100, avec système de gradient et chambre thermostatée pour la colonne.
- Injecteur automatique : PHILIPS modèle "MARATHON".
- Colonne : SUPELCO modèle Supelcosil LC - 18 (5 µm), 250x4,6 mm, précédée d'une colonne de garde de 3 cm.
- Détecteur : PHILIPS modèle PYE UNICAM PU 4021, à barrettes de diodes.
- Interface Détecteur/Microordinateur : PHILIPS modèle PU 6030 DCU.
- Système d'intégration : logiciel d'intégration PU6000.
- Standards : Caféine anhydre : CARLO ERBA. Théophylline anhydre, Théobromine, 1,7-méthylxanthine 98 %, 1-méthylxanthine, 3-méthylxanthine, 7-méthylxanthine et B-hydroxyéthylthéophylline : SIGMA.

3.6.3.2. Conditions opératoires standards

La séparation des méthylxanthines réalisée en CLHP utilise une méthode par gradient, à un débit de 2 ml.min⁻¹. Les deux phases mobiles sont constituées du mélange : acide *O*-phosphorique 1,75 mM/acétonitrile/tétrahydrofurane 98:1:1 (v/v/v) pour l'éluant A, et du mélange acétonitrile/tétrahydrofurane 99:1 (v/v) pour l'éluant B. Le gradient est réalisé comme indiqué dans la figure 4.2 du paragraphe 4.3.2., présentant le profil chromatographique d'une solution de standards en mélange. La colonne est placée dans un four à 32°C.

La calibration est réalisée par étalonnage interne et à l'aide de solutions de standards à différentes concentrations connues (de 2,5 à 25 mg.l⁻¹). L'étalon interne est la β -hydroxyéthylthéophylline, ajouté à une concentration finale de 10 mg.l⁻¹.

3.7. ETUDE DE L'ACTIVITE DEMETHYLASIQUE CHEZ *Aspergillus* V12A25

3.7.1. Obtention d'un extrait intracellulaire brut

A partir d'une culture d'*Aspergillus* V12A25 de 48 h. environ en milieu Caféine-Saccharose de base (paragraphe 3.2.3.1.) et dans les conditions décrites au paragraphe 3.3.3., 80 à 90 ml d'échantillon sont utilisés pour l'extraction du contenu intracellulaire de la masse mycélienne. Le reste de la culture est utilisé pour la détermination de la biomasse, le dosage des méthylxanthines et le contrôle du bon développement du champignon (essentiellement : long mycélium et absence ou rare conidiogénèse).

Le traitement de la biomasse fraîche est réalisé aussi rapidement et aussi stérilement que possible. L'eau milliQ et les tampons utilisés sont filtrés sur des membranes de porosité 0,45 μ m, et sont maintenus à +4°C. Le traitement se déroule selon les 11 étapes suivantes :

- 1- Lavage de la biomasse par quatre volumes d'eau, à l'aide d'un système de filtration MILLIPORE constitué d'une simple grille permettant de retenir uniquement le mycélium
- 2- Lavage de la biomasse par 100 ml de tampon (généralement le tampon phosphate 50 mM, pH 7,6 + Dithiothréitol 0,1 mM)
- 3- Récupération de la biomasse et absorption de l'excédant de tampon sur papier Whatmann n°1
- 4- Pesée de la biomasse et ajout du double de poids de Sable de Fontainebleau (stérile et à +4°C)
- 5- Broyage de la biomasse durant 5 min. environ au mortier en porcelaine émaillée n°3 - OSI (stérile et à -20°C)
- 6- Homogénéisation du broyat dans 4 ml du même tampon, puis transfert dans un tube Falcon stérile de 15 ml
- 7- Rinçage des parois du mortier par 1 ml du même tampon

- 8- Centrifugation du broyat : 5.000 g/15 min./4°C (centrifugeuse SIGMA 3K-2)
 - 9- Récupération du surnageant et élimination du culot
 - 10- Ultracentrifugation du surnageant : 200.000 g/1 h./4°C (ultracentrifugeuse BECKMAN L7 ; rotor angulaire)
 - 11- Récupération du surnageant et filtration 0,22 ou 0,45 μm avant utilisation directe ou stockage à -20 ou -80°C.
- Ce surnageant constitue l'extract intracellulaire brut (EIB).

3.7.2. Mise en œuvre des essais enzymatiques

Les essais enzymatiques sont réalisés en microtubes Eppendorf de 1,5 ml stériles. Les volumes réactionnels sont de 1 ml. Après introduction du substrat et autres cofacteurs sous forme de solutions mères dans les microtubes, la réaction est initialisée par ajout de l'extract intracellulaire brut ou de tout autre extract protéique. Les microtubes sont incubés dans un bain-marie thermostaté à 30°C, pendant 2 à 3 heures en général. La réaction est stoppée par addition de 50 μl d'une solution d'acide trichloracétique (TCA) à 50 % (p/v). Après 10 min. à température ambiante, les tubes sont centrifugés (10.000 rpm/5 min). Les surnageants sont congelés à -20°C avant analyse (paragraphe 3.6.1.).

Des témoins sont réalisés dans les mêmes conditions que les essais, l'addition du TCA se faisant avant l'ajout de l'extract protéique.

Sauf indication contraire, les conditions standards mises au point puis utilisées pour la réaction enzymatique de déméthylation de la caféine sont les suivantes :

Caféine : 0,5 mM

NADPH : 0,5 mM

MgCl₂.6H₂O : 2,5 mM

Protéines totales : 1,0 à 1,8 mg

Tampon phosphate : 50 mM pH 7,6 + DTT 0,1 mM - cas des extraits bruts

20 mM pH 7,4 + DTT 0,1 mM - cas des extraits traités

Température de réaction : 30°C ; incubation de 2 à 3 heures

Dans ces conditions expérimentales, l'activité déméthylasique et plus particulièrement l'activité caféine déméthylase est définie comme suit : elle correspond au nombre de picomoles de triméthylxanthine consommée, par minute de réaction à 30°C, et par milligramme de protéines présentes dans le volume réactionnel (1 ml). L'activité enzymatique est notée A.D. et a pour unité : $\text{pmol caf.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. Le calcul de l'activité déméthylasique est détaillé au paragraphe 3.10.3.

3.8. TECHNIQUES DE PURIFICATION DES DEMETHYLASES

3.8.1. Techniques de dessalage/concentration

Plusieurs techniques classiques de dessalage et/ou de concentration sur les extraits intracellulaires bruts d'*Aspergillus* V12A25 sont testées.

3.8.1.1. Dialyse

La dialyse est réalisée à l'aide de boudins dont la limite d'exclusion est de 10 kDa. Les boudins sont placés dans 2 litres de tampon à +4°C. Le tampon est changé 3 fois toutes les 2 heures et le dernier bain est maintenu pendant une nuit à +4°C. Les tampons testés sont : le tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 ; seul, avec de l'acide L(+)-ascorbique à 1 mM, ou du DL-Dithiothréitol à 0,1 mM.

3.8.1.2. Ultrafiltration

Deux systèmes sont testés (toutes les opérations étant réalisées à +4°C) :

- Cellules à agitation magnétique (AMICON) : ces cellules sont munies de membranes type PM10 (seuil de coupure de 10 kDa). Une surpression est appliquée avec de l'azote. Une agitation douce permet d'éviter le colmatage.
- Microconcentrateurs Microsep (FILTRON) : l'ultrafiltration est réalisée grâce à la force centrifuge (utilisation d'un rotor angulaire). Les microconcentrateurs sont munis de membranes type OMEGA dont les seuils de coupure vont de 1 à 1000 kDa. Les centrifugations sont conduites à des accélérations n'excédant pas 7.500 g.

3.8.1.3. Colonne de dessalage "PD-10"

Ce système développé par PHARMACIA est basé sur le principe de la chromatographie en Gel Filtration. Le gel est du type Sephadex G-25 (limites d'exclusion 1-5 kDa). Les colonnes contiennent 9,1 ml de gel. Elles sont équilibrées en tampon phosphate 20 mM, pH 7,4 + DTT 0,1 mM, et maintenues à +4°C. Le même tampon est utilisé pour l'élution des protéines (à +4°C).

Le dessalage d'un extrait intracellulaire est réalisé à froid de la manière suivante : après dépôt et pénétration de 1 ml d'extrait en surface du gel, l'échantillon est élué par simple gravimétrie, en ajoutant du tampon d'élution dans la partie supérieure de la colonne. Les 30 premières gouttes sont écartées, les 54 suivantes (soit environ 3 ml) constituent la fraction protéique, puis les 54 dernières, la fraction "salée". Le gel est rincé à l'aide du même tampon par trois volumes de colonne au moins avant d'être réutilisé.

3.8.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

Nous avons réalisé des essais de précipitation fractionnée de l'extrait intracellulaire brut, par ajout de sulfate d'ammonium à +4°C, selon la méthode rapportée par HARRIS et ANGAL (1989). Des fractions protéiques sont obtenues après addition successive de sulfate d'ammonium à 25, 50 et 75 % de saturation dans 20 ml d'extrait brut. Elles sont reprises puis dessalées sur cellules AMICON avec un tampon phosphate 50 mM, pH 7,4, avant d'être testées.

3.8.3. Système automatisé de purification des protéines

3.8.3.1. Matériel

Le matériel utilisé pour la purification des protéines est le suivant :

- Système Waters 650E : comprenant la pompe 650E (munie d'un système "Auto-Blend"), le boîtier de contrôle 600 et la vanne d'injection manuelle Rheodyne 9125.
- Détecteur multicanaux UV/Visible : Waters 490E.
- Collecteur de fractions (WATERS).
- Système informatisé d'acquisition des données et de pilotage du système : logiciel Millenium 2010 (WATERS).
- Colonne de gel filtration : Protein-Pak 300SW (Réf. : WAT011787 ; dimensions : 8x300 mm ; limites d'exclusion : 10-300 kDa)

3.8.3.2. Conditions opératoires

Les tampons sont préparés à l'aide d'eau milliQ et sont filtrés quotidiennement sur membrane de porosité 0,45 µm. L'élution est réalisée à température ambiante, mais les fractions protéiques sont collectées dans des tubes plongeant dans de l'eau glacée. La colonne est équilibrée en tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 + DTT 0,1 mM. La nature des échantillons injectés est précisée au paragraphe 7.5.2. Les volumes injectés sont de 100 µl. L'élution est réalisée en moins de 30 min. avec le même tampon à un débit de 0,8 ml.min⁻¹. Des fractions de 0,8 ml sont récoltées.

3.9. PLANIFICATION EXPERIMENTALE

Afin d'étudier plus précisément l'effet de divers facteurs nutritionnels et environnementaux sur la dégradation de la caféine par les deux souches, nous avons utilisé une méthode de planification expérimentale à base de plans factoriels fractionnaires à deux niveaux. Une matrice d'Hadamard à 7 facteurs (au plus) et 8 essais sert de support pour la constitution des essais à réaliser (Tableau 3.1). Cette matrice, de type "screening" permet de tester les effets principaux de nombreux facteurs sur une réponse donnée, mais ne peut rendre compte des éventuels effets dus aux interactions entre facteurs (PHAN-TAN-LUU et coll., 1983 ; CONSTANT, 1990).

Tableau 3.1 : Matrice d'Hadamard à 7 facteurs et 8 essais utilisée pour les plans d'expérience.

Essais n°	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Facteur 4	Facteur 5	Facteur 6	Facteur 7
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Le choix des facteurs et de leurs niveaux sont donnés dans le chapitre 6, au moment de l'utilisation du plan d'expérience. Les réponses analysées sont (paragraphe 3.10.2.) :

- la vitesse maximale de dégradation de la caféine,
- la vitesse moyenne de dégradation de la caféine,
- la production maximale de biomasse et/ou la vitesse maximale de production de biomasse.

L'analyse statistique des réponses obtenues, est réalisée à l'aide du logiciel "Stat View" (Bacus Concept, Inc.). Cette analyse permet de comparer l'effet relatif des facteurs sur chacune des réponses. La valeur de l'effet relatif est comprise entre -1 et +1 : plus cette valeur est proche des extrêmes, plus le facteur influe sur la réponse analysée. Inversement, plus elle est proche de 0, moins le facteur a d'effet, entre les deux niveaux considérés. Un test t (et sa probabilité p associée) est réalisé par le logiciel d'analyse statistique. Ce test permet de définir plus précisément si le facteur considéré a un effet réellement significatif sur la réponse. On remarquera cependant que ce test ne peut être réalisé que dans la mesure où moins de sept facteurs sont étudiés dans ce plan d'expérience ; ou bien si des répétitions sont effectuées.

3.10. EXPRESSION DES RESULTATS

3.10.1. Calcul des distances de migration (Rf)

Une distance de migration (Rf) correspondent à la distance parcourue par une substance X par rapport à celle parcourue par le front du solvant. Elle est donc comprise entre 0 et 1. Un écart-type est calculé pour chaque substance. Il permet de rendre compte de la dispersion de la tache formée sur la plaque chromatographique.

3.10.2. Croissance mycélienne et vitesses de dégradation de la caféine

Pour l'étude physiologique des champignons filamenteux cultivés en milieux liquides, deux paramètres sont principalement suivis au cours du temps. Il s'agit de la concentration en caféine, et de la biomasse. Les quatre grandeurs calculées à partir de ces cinétiques sont :

- la vitesse maximale de dégradation de la caféine, correspondant à la pente maximale de la courbe : [caféine] = f(temps) (unité : $\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$).
- la vitesse moyenne de dégradation de la caféine, correspondant au temps mis par la souche pour dégrader plus de 99 % de la caféine du milieu (unité : $\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$).
- la production maximale de biomasse (unité : g.l^{-1}).
- la vitesse maximale de production de biomasse, correspondant à la pente maximale de la courbe : [biomasse] = f(temps) (unité : $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Remarque : pour certaines études, le dosage de la biomasse est limitée à la détermination de la biomasse maximale, ce qui permet d'augmenter la fréquence des prélèvements par diminution du volume des échantillons prélevés.

3.10.3. Calcul de l'activité déméthylasique

Le calcul de l'activité déméthylasique (A.D.) est réalisé à partir des résultats de l'analyse quantitative des méthylxanthines par CLHP (paragraphe 3.6.1.1.). Il s'exprime selon les formules :

$$\Delta\text{MX} = (\text{MX}_i - \text{MX}_f) \times D \times E$$

où :

ΔMX : méthylxanthine consommée au cours de la réaction dans le volume réactionnel (mg.l^{-1})

MX_i : concentration de la méthylxanthine pour les essais témoins (où le TCA est ajouté avant l'extrait protéique au volume réactionnel), donnée par le système d'intégration de la CLHP (mg.l^{-1})

MX_f : concentration de la méthylxanthine pour les essais après réaction enzymatique, donnée par le système d'intégration de la CLHP (mg.l^{-1})

D : facteur de dilution de l'échantillon pour l'analyse en CLHP

E : facteur permettant de revenir à la concentration en méthylxanthine dans le volume réactionnel, tenant compte de la méthode d'extraction et de la dilution par addition du TCA dans le volume réactionnel ($E = 2,1$).

$$\text{A.D.} = \Delta\text{MX} \cdot 10^9 \times \text{VR} / \text{MM} / t / p$$

où :

$\Delta\text{MX} \cdot 10^9$: méthylxanthine consommée, ramené en pg.l^{-1}

VR : volume réactionnel (l)

MM : masse molaire de la méthylxanthine (g.mol^{-1})

t : temps de la réaction enzymatique (min)

p : quantité de protéines dans le volume réactionnel (mg).

**METHODES D'ANALYSE
DES METHYLXANTHINES**

4. METHODES D'ANALYSE DES METHYLYXANTHINES

Dans ce chapitre, nous présenterons les deux méthodes d'analyse des méthylxanthines par chromatographie sur couche mince (CCM) et par chromatographie liquide haute performance (CLHP), mises au point lors de ces travaux. Ces méthodes permettent respectivement l'évaluation qualitative et quantitative de l'ensemble des méthylxanthines susceptibles d'être obtenues par réactions de déméthylation de la caféine par les cellules entières ou à partir d'extraits protéiques.

4.1. OPTIMISATION DU SOLVANT D'EXTRACTION DES METHYLYXANTHINES

L'extraction des méthylxanthines libérées au cours des réactions enzymatiques, est une étape nécessaire pour l'étude des décaféinases. Lors de l'analyse qualitative en CCM, les activités déméthylasiques sont mises en évidence par l'apparition des produits de la réaction. Ces activités étant assez faibles, il est nécessaire d'isoler et de concentrer les produits formés afin de mieux les visualiser. De même, l'extraction des méthylxanthines va permettre d'éliminer tout composé pouvant interférer au cours des analyses chromatographiques. Pour des raisons similaires, cette étape d'extraction a été également utilisée pour déterminer quantitativement l'activité enzymatique des différents échantillons par CLHP.

4.1.1. Extraction de la caféine et d'un étalon interne

En règle générale, avant toute étape d'extraction, il est courant d'ajouter à l'échantillon un composé étalon en concentration connue. La β -hydroxyéthylthéophylline étant déjà utilisée comme étalon interne pour l'analyse "en routine" de la caféine et des méthylxanthines par CLHP (paragraphe 3.6.3.), nous avons choisi cette molécule comme standard d'extraction. L'étalon rend normalement compte du rendement d'extraction et permet de corriger les concentrations des produits extraits. Néanmoins, il faut s'assurer au préalable que le comportement de cet étalon vis-à-vis de l'extraction, est identique à celui de ces produits.

Dans ce but, deux systèmes de solvants issus de la littérature ont été testés pour leur capacité d'extraction de la caféine et de la β -hydroxyéthylthéophylline contenues dans une phase aqueuse :

- éther isopropylique/isopropanol, 70:30 - v/v (FUHR et coll., 1992)
- chloroforme/isopropanol, 85:15 - v/v (BERTHOU et coll., 1989 ; AGÚNDEZ et coll., 1992).

Cette étude a été réalisée sur des échantillons témoins d'essais enzymatiques (paragraphe 3.7.2.) contenant de la caféine à environ 1 mM. Ces échantillons ont été dilués, et de la β -hydroxyéthylthéophylline a été ajoutée à 10 mg.l⁻¹ en concentration finale. L'extraction des composés a ensuite été réalisée dans les conditions décrites au paragraphe 3.6.1.1., à l'aide des deux systèmes de solvants. Après évaporation de la phase organique, les extraits secs ont été repris dans de l'eau puis analysés par CLHP de manière standard.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4.1. Ils sont exprimés en unité de surface pour la β -hydroxyéthylthéophylline. La concentration en caféine exprimée en mM est celle donnée par la méthode d'intégration, corrigée du facteur de dilution. Les essais "sans extraction" correspondent à la solution mère de β -hydroxyéthylthéophylline directement analysée par CLHP.

Tableau 4.1 : Etude de deux systèmes d'extraction : rendements d'extraction de la β -hydroxyéthylthéophylline (BOH-THP) et effet sur la détermination de la concentration en caféine par la méthode de CLHP (moyennes et écart-types sur cinq répétitions).

Systèmes d'extraction	Surface moyenne BOH-THP	Rendement d'extraction de la BOH-THP	Caféine (mM)
sans extraction	191 (± 1 %)	-	≈ 1
éther isopropylique / isopropanol 70:30 (v/v)	60 ($\pm 1,8$ %)	31 %	$1,39 \pm 0,02$
chloroforme / isopropanol 85:15 (v/v)	165 ($\pm 1,8$ %)	86 %	$1,09 \pm 0,01$

Les deux systèmes donnent des résultats très différents vis-à-vis de l'extraction de la β -hydroxyéthylthéophylline. Alors que le système chloroforme/isopropanol permet la récupération de 86 % de l'étalon interne, le système éther isopropylique/isopropanol ne permet d'extraire que 31 % de β -hydroxyéthylthéophylline. Le second système est donc moins efficace que le premier.

Par ailleurs, les concentrations en caféine mesurées sont supérieures à celles escomptées. L'hypothèse la plus probable expliquant ces différences, est que le rendement d'extraction de la caféine est supérieur à celui de l'étalon interne, quelque soit le système d'extraction.

On peut alors supposer que la caféine a été extraite avec un facteur légèrement supérieur à 86 % dans le cas du système chloroforme/isopropanol, et nettement supérieur à 31 % dans le cas du système éther isopropylique/isopropanol. BERTHOU et coll. (1989) avaient en effet obtenu un rendement de 100 ± 1 % pour la caféine avec le même système chloroforme/isopropanol.

Par la suite, la β -hydroxyéthylthéophylline n'a été utilisée que comme étalon interne lors de l'analyse en CLHP.

4.1.2. Extraction des méthylxanthines

Une deuxième série d'expériences a été entreprise afin d'optimiser les rendements d'extraction des méthylxanthines à l'aide d'un système chloroforme/isopropanol ; sans ajouter préalablement d'étalon interne.

Trois proportions (85:15 ; 65:35 et 50:50 - v/v) du mélange chloroforme/isopropanol ont été testées sur une solution aqueuse contenant les sept méthylxanthines. L'analyse par CLHP nous a permis de déterminer les pourcentages résiduels de chaque méthylxanthine contenue dans la phase aqueuse (donc non extraite) après une simple, double ou triple extraction réalisée dans les conditions décrites au paragraphe 3.6.1.1. (Tableau 4.2). Une interférence, certainement due à la présence d'isopropanol dans les échantillons analysés, n'a cependant pas permis de déterminer avec certitude les pourcentages de la 7-méthylxanthine. C'est pourquoi ceux-ci ne figurent pas dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2 : Pourcentages des méthylxanthines restant dans la phase aqueuse après une simple, double ou triple extraction par le système chloroforme/isopropanol à différentes proportions.

Méthyl- xanthines	Système Chloroforme/Isopropanol (v/v)								
	85:15			65:35			50:50		
	simple extraction	double extraction	triple extraction	simple extraction	double extraction	triple extraction	simple extraction	double extraction	triple extraction
3MX	51	30	21	60	38	27	21	8	0
1MX	61	21	10	72	30	17	14	0	0
THB	22	5	2	29	7	0	12	2	0
PAR	22	2	0	27	5	0	8	0	0
THP	14	0	0	17	0	0	4	0	0
CAF	3	0	0	4	0	0	6	0	0

Quelques soient les proportions du système chloroforme/isopropanol, une double extraction permet d'extraire la caféine et les diméthylxanthines (THB, PAR, THP) avec des rendements allant de 93 à 100 %. Par contre, seul le système chloroforme/isopropanol à 50:50 (v/v) se révèle réellement efficace pour l'extraction des monométhylxanthines dès la deuxième reprise. L'utilisation d'un système moyennement apolaire semble donc préférable à celle d'un système fortement apolaire pour l'extraction des monométhylxanthines. Cependant, plus le système d'extraction est polaire, plus la séparation des phases aqueuse et organique est longue, ce qui rend l'analyse moins facile et moins rapide à réaliser.

Nos résultats sont similaires à ceux de BERTHOU et coll. (1989), qui après une simple extraction de 2 heures au chloroforme/isopropanol 85:15 (v/v), en présence de quantités saturantes de sulfate d'ammonium, ont obtenu des rendements d'extraction de : 100 % pour la caféine, la théophylline et la paraxanthine ; 99 % pour la théobromine ; 95 à 98 % pour les monométhylxanthines. La différence entre les deux méthodes réside dans la durée de l'extraction : dans notre cas, celle-ci se limite à deux fois 30 secondes.

En conclusion, pour mettre en évidence l'activité caféine déméthylase, une double extraction par le système chloroforme/isopropanol 85:15 (v/v) sera adoptée. Pour étudier les activités diméthylxanthine ou monométhylxanthine déméthylases, on retiendra une double, voire triple extraction par le système chloroforme/isopropanol 50:50 (v/v), dans les mêmes conditions.

4.2. MISE AU POINT DE LA METHODE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

4.2.1. Phase stationnaire et support

La phase stationnaire utilisée pour la séparation des méthylxanthines par chromatographie sur couche mince (CCM), est un gel de silice contenant un indicateur de fluorescence. Cette phase étant la plus citée dans la littérature, nous n'avons pas cherché à en tester d'autres (BLECHER et LINGENS, 1977 ; FRISCHKNECHT et BAUMANN, 1980 ; PETERMANN et BAUMANN, 1983 ; SUZUKI et WALLER, 1984a). Le type de support choisi est une plaque en aluminium, qui s'est avéré plus facile d'utilisation que le support en plastique.

4.2.2. Choix du solvant de migration

Différents solvants de migration ont été étudiés, avec pour principal objectif d'obtenir la meilleure séparation entre toutes les méthylxanthines.

4.2.2.1. Essais préliminaires

Dans un premier temps, nous avons utilisé six phases mobiles référencées dans la littérature (Tableau 4.3) et nous avons cherché celles qui permettaient de séparer la caféine, la théophylline, la théobromine et la paraxanthine.

La meilleure phase mobile est composée du mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ à 90:10 (Tableau 4.3, n°2). Elle permet d'une part d'isoler l'ensemble des monométhylxanthines (R_f de 0,23 à 0,27) du groupe des diméthylxanthines et de la caféine ; et d'autre part de bien différencier entre elles la caféine, la théophylline, la théobromine et la paraxanthine (R_f de 0,61 ; 0,49 ; 0,45 et 0,40 respectivement).

On remarque qu'une phase mobile trop fortement apolaire ne permet ni une importante migration, ni une bonne séparation des composés (Tableau 4.3, n°1). FRISCHKNECHT et BAUMANN, (1979) ont obtenu des résultats similaires avec ce même solvant de migration, sauf pour la caféine et la théophylline pour lesquelles les Rf étaient plus importants (CAF : 0,46 et THP : 0,28). Ceci leur a permis de mieux différencier la théophylline de la théobromine.

Enfin, si les systèmes peu apolaires (présence d'eau) permettent une bonne migration des monométhylxanthines, ils engendrent cependant des problèmes de résolution entre diméthylxanthines et caféine (Tableau 4.3, n°3 à 6).

Tableau 4.3 : Distances de migration (et écart-types) des méthylxanthines séparées en CCM par différents solvants de migrations issus de la littérature.

Phases mobiles (volumes)	CAF	THP	PAR	THB	1MX	3MX	7MX	Réf. Biblio. (solvant de migration)
1. CHCl ₃ /MeOH 95:5	0,37 0,04	0,23 0,04	0,20 0,03	0,23 0,02	0,10 0,02	0,10 0,02	0,08 0,02	FRISCHKNECHT et BAUMANN (1979 et 1980)
2. CHCl ₃ /MeOH 90:10	0,61 0,02	0,49 0,02	0,40 0,02	0,45 0,02	0,26 0,02	0,27 0,02	0,23 0,01	ROBERTS et WALLER (1979) SUZUKI et WALLER (1984a)
3. PrOH-2/CHCl ₃ /H ₂ O/ NH ₄ OH 60:20:10:3	0,82 0,02	0,59 0,02	0,58 0,02	0,73 0,03	0,39 0,02	0,43 0,03	0,36 0,02	BLECHER et LINGENS (1977)
4. PrOH-2/NH ₄ OH/H ₂ O 5:3:2	0,85 0,03	0,85 0,03	0,78 0,03	0,79 0,03	0,81 0,03	0,86 0,03	0,77 0,01	SUZUKI et WALLER (1988)
5. AcEt/H ₂ O/HCOOH 65:35:5	0,34 0,02	0,38 0,03	0,29 0,02	0,27 0,02	0,29 0,03	0,28 0,02	0,19 0,03	PETERMANN et BAUMANN (1983) SUZUKI et WALLER (1988)
6. BuOH/AcOH/H ₂ O 25:4:10	0,47 0,04	0,57 0,04	0,47 0,04	0,42 0,02	0,57 0,04	0,53 0,02	0,41 0,02	SUZUKI et WALLER (1984a)

4.2.2.2. Essais complémentaires

Dans un deuxième temps, nous avons testé d'autres systèmes de migration, afin d'améliorer la séparation de toutes les méthylxanthines (Tableau 4.4).

Parmi les essais n°7, 8 et 9 contenant une phase aqueuse, seul le système n°8 permet une bonne séparation entre les di- et tri-méthylxanthines. Parallèlement, un échantillon correspondant à un essai enzymatique témoin (réaction de déméthylation inhibée) a été déposé à chaque essai. Or, lorsqu'un système peu apolaire est utilisé, on observe que des composés migrent à partir de ces échantillons et peuvent interférer lors de la lecture des plaques. C'est pourquoi nous avons préféré utiliser des solvants plutôt apolaires pour la suite de cette étude.

Nous avons fait varier les proportions entre le chloroforme, le méthanol et l'isopropanol (Tableau 4.4, n°10 à 18). En systèmes binaires (Tableau 4.4, n°10 à 12), les résultats montrent que les deux derniers solvants ne peuvent pas être utilisés en trop fortes proportions par rapport au chloroforme sans engendrer une mauvaise séparation entre la caféine et la théophylline.

Avec un système ternaire, la meilleure séparation entre la caféine, la théophylline, la théobromine et la paraxanthine est obtenue avec le système n°16 : CHCl₃/MeOH/PrOH-2 90:8:7 (v/v/v), où le temps de migration est réduit à 20 min. Néanmoins, ce système ne permet pas de distinguer la 3-méthylxanthine de la 1-méthylxanthine. La présence de butanol-1 semblait améliorer la séparation entre les monométhylxanthines (Tableau 4.3, n°6 et tableau 4.4, n°7), mais les essais complémentaires n°19 et 20 n'ont pas été concluants.

Tableau 4.4 : Distances de migration (et écart-types) des méthylxanthines séparées en CCM par différents solvants de migrations.

Phases mobiles (volumes)	CAF	THP	PAR	THB	1MX	3MX	7MX
7. BuOH/HCOOH/H ₂ O 75:15:10	0,46 0,03	0,59 0,04	0,47 0,04	0,39 0,04	0,59 0,03	0,51 0,03	0,36 0,03
8. CHCl ₃ /PrOH/H ₂ O/NH ₄ OH 40:50:7:3	0,76 0,04	0,50 0,04	0,58 0,04	0,68 0,04	0,31 0,05	0,32 0,04	0,34 0,04
9. CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O/NH ₄ OH 50:50:7:3	0,92 0,02	0,79 0,02	0,82 0,02	0,84 0,03	0,60 0,02	0,62 0,02	0,64 0,02
10. CHCl ₃ /MeOH 80:20	0,69 0,02	0,62 0,02	0,55 0,04	0,58 0,02	0,47 0,02	0,46 0,02	0,40 0,02
11. CHCl ₃ /MeOH 85:15	0,67 0,02	0,57 0,02	0,48 0,03	0,51 0,03	0,35 0,03	0,34 0,03	0,30 0,02
12. CHCl ₃ /PrOH-2 80:20	0,47 0,03	0,47 0,02	0,33 0,04	0,34 0,02	0,29 0,02	0,22 0,02	0,17 0,02
13. CHCl ₃ /MeOH/PrOH-2 85:10:5	0,64 0,03	0,55 0,03	0,45 0,03	0,48 0,03	0,33 0,03	0,31 0,02	0,25 0,02
14. CHCl ₃ /MeOH/PrOH-2 85:10:10	0,66 0,04	0,59 0,04	0,49 0,02	0,52 0,04	0,39 0,02	0,36 0,02	0,28 0,02
15. CHCl ₃ /MeOH/PrOH-2 85:8:7	0,66 0,04	0,55 0,04	0,45 0,04	0,48 0,04	0,31 0,02	0,30 0,02	0,23 0,02
16. CHCl ₃ /MeOH/PrOH-2 90:8:7	0,66 0,02	0,54 0,02	0,42 0,04	0,47 0,04	0,30 0,02	0,29 0,02	0,20 0,02
17. CHCl ₃ /MeOH/PrOH-2 90:8:15	0,67 0,02	0,60 0,02	0,47 0,03	0,49 0,03	0,38 0,03	0,34 0,03	0,26 0,02
18. CHCl ₃ /MeOH/PrOH-2 90:10:10	0,66 0,02	0,59 0,02	0,48 0,02	0,52 0,02	0,36 0,02	0,35 0,02	0,27 0,02
19. CHCl ₃ /MeOH/BuOH 90:8:7	0,65 0,03	0,51 0,05	0,40 0,03	0,43 0,03	0,26 0,02	0,26 0,02	0,20 0,02
20. CHCl ₃ /MeOH/BuOH 85:8:12	0,71 0,04	0,60 0,04	0,46 0,04	0,49 0,04	0,33 0,04	0,33 0,02	0,24 0,02

On rappellera que l'objectif de cette étude était de pouvoir mettre en évidence par chromatographie sur couche mince, les méthylxanthines issues de l'activité caféine déméthylase. Celles-ci correspondent principalement à la théophylline et à la 3-méthylxanthine (chapitre 7). Dans ce but, le système de séparation n°16 est tout à fait satisfaisant.

Néanmoins, s'il devait s'avérer nécessaire de mieux séparer les monométhylxanthines entre elles, il sera possible de réaliser une deuxième séparation en utilisant un solvant de migration plus adapté, comme les systèmes n°12 ou 17 (Tableau 4.4). L'utilisation de deux systèmes spécifiques soit aux monométhylxanthines, soit à la caféine et aux diméthylxanthines, avait déjà été suggéré par SUZUKI et WALLER (1984a).

4.2.3. Seuil de visualisation des méthylxanthines

La détermination du seuil de visualisation des méthylxanthines a été réalisée à l'aide d'une solution contenant 40 mg.l⁻¹ de caféine, de théophylline et de 3-méthylxanthine en tampon phosphate 50 mM, pH 7,8. Une double extraction par le mélange chloroforme/isopropanol 50:50 (v/v) a été effectuée sur plusieurs échantillons de 500 µl de cette solution. Les résidus obtenus après évaporation ont été repris par des volumes croissants du même solvant d'extraction, de 100 à 2600 µl. 20 µl ont été déposés sur une plaque chromatographique, correspondant respectivement à des dépôts de 4 à 0,15 µg de chaque méthylxanthine (en supposant un rendement d'extraction égal à 100 %). La séparation des composés a été réalisée à l'aide du système de migration n°16, défini précédemment : CHCl₃/MeOH/PrOH-2 90:8:7 (v/v/v).

Les trois méthylxanthines issues du dépôt contenant la plus faible quantité de produits, sont toujours visibles sous UV. Le seuil de visualisation des méthylxanthines est donc inférieur à 0,15 µg. Cette valeur correspond à une concentration de 0,75 mg.l⁻¹ en méthylxanthine d'un échantillon traité dans les conditions standards définies au paragraphe 3.6.1.2. Ainsi, toute activité caféine déméthylase libérant 0,75 mg.l⁻¹ de théophylline lors d'une réaction enzymatique, sera détectable par CCM. Dans des conditions standards (paragraphe 3.7.2.), cette concentration équivaut à un taux de transformation de la caféine de 0,87 %. Une dégradation de la caféine aussi faible serait difficilement mesurable par analyse quantitative en CLHP.

L'analyse en CCM est donc une bonne méthode qualitative pour la détection des activités déméthylasiques (même faibles). De plus, cette technique est plus rapide que celle par CLHP, car elle permet de traiter simultanément de nombreux échantillons. De ce fait, cette méthode pourra s'appliquer à la mise en évidence de l'effet de multiples composés (cofacteurs, inhibiteurs,...) sur l'activité enzymatique, ou à la localisation de fractions protéiques actives lors des étapes de purification des enzymes.

4.3. METHODE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

4.3.1. Méthode préliminaire

Lors de travaux antérieurs, une méthode d'analyse des méthylxanthines par chromatographie liquide haute performance (CLHP) a été mise au point (DENIS, 1992). L'ensemble du matériel, ainsi que la composition des solvants utilisés en gradient pour la séparation des méthylxanthines étaient identiques à ceux décrit au paragraphe 3.6.3.

Par contre, le gradient utilisé dans cette méthode nécessitait des conditions de forte apolarité afin d'éluer la phénacétine, correspondant à l'étalon interne (Figure 4.1). L'utilisation de la phénacétine présentait en fait quelques inconvénients, dont principalement l'allongement du temps d'analyse des échantillons. C'est pourquoi nous avons cherché à améliorer cette méthode.

4.3.2. Amélioration de la méthode

Afin de pallier à ses inconvénients, nous avons décidé de changer d'étalon interne, en recherchant plus particulièrement une molécule pouvant s'intercaler entre nos composés à analyser.

Plusieurs méthodes décrites dans la littérature font état de l'utilisation de composés dérivés de la théophylline comme étalon interne : la β -hydroxyéthylthéophylline (ARAMAKI et coll., 1991 ; DOBROCKY et coll., 1994) ; l'hydroxypropylthéophylline (FUHR et coll., 1992) ou la 8-chlorothéophylline (BERTHOU et coll., 1989 ; TANAKA et coll., 1992). Nous avons retenu la β -hydroxyéthylthéophylline, car elle présentait un temps de rétention inférieur à celui de la caféine.

La β -hydroxyéthylthéophylline a été testée seule et en mélange avec les sept méthylxanthines selon les conditions opératoires décrites par DENIS (1992). Ce composé n'a pas créé d'interférence avec les méthylxanthines et a été élué entre la théophylline et la caféine avec une bonne résolution. Ceci a permis de simplifier la méthode préliminaire par gradient, en supprimant notamment le dernier palier à 50 % d'acétonitrile (Figure 4.1). La méthode ainsi optimisée est présentée sur la figure 4.2.

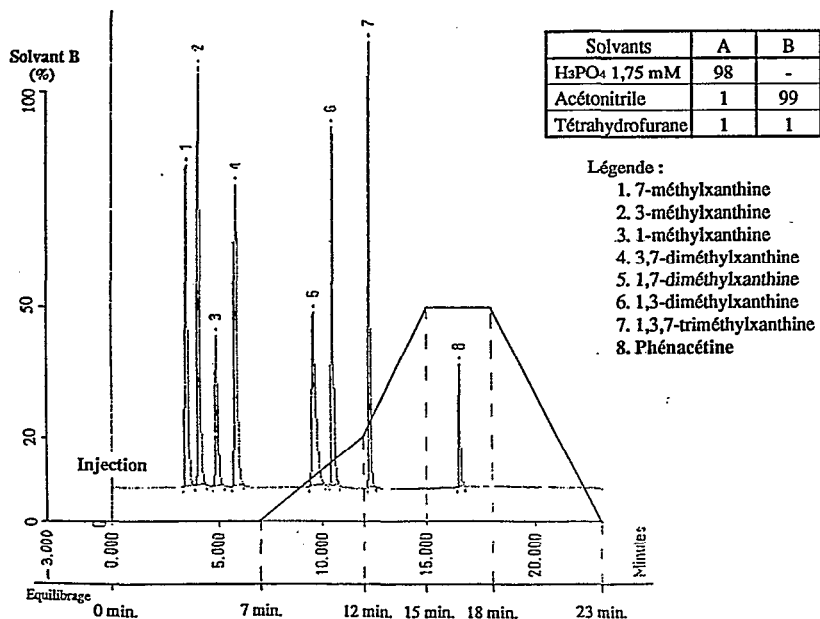


Figure 4.1 : Profil d'élution d'un mélange standard de méthylxanthines en CLHP, avec la phénacétine comme étalon interne : méthode préliminaire (DENIS, 1992).

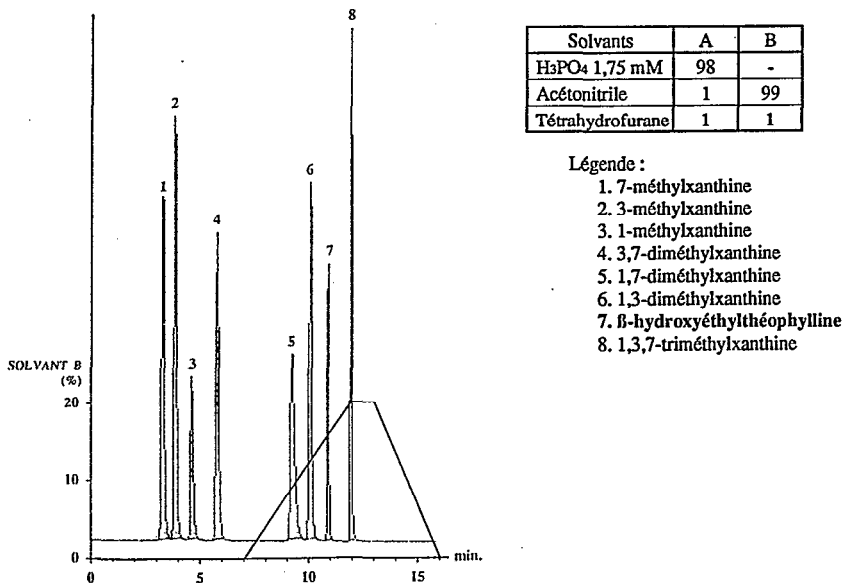


Figure 4.2 : Profil d'élution d'un mélange standard de méthylxanthines en CLHP, avec la β -hydroxyéthylthéophylline comme étalon interne : nouvelle méthode.

Le choix de la β -hydroxyéthylthéophylline comme étalon interne, a donc permis d'améliorer la méthode de dosage des méthylxanthines par chromatographie liquide haute performance, et notamment :

- de diminuer l'apolarité de la phase mobile,
- de limiter la consommation d'acétonitrile (et de tétrahydrofurane),
- d'éviter le mauvais mélange entre le système aqueux et le système organique en proportion élevée (formation de bulles),
- de diminuer le temps d'analyse d'un échantillon qui passe de 26 min. pour l'ancienne méthode, à 19 min. pour la nouvelle.

La méthode développée est très comparable à celles couramment exposées dans la littérature pour l'étude du métabolisme de la caféine dans les cellules végétales ou animales (chapitre 2). Les différences qui existent entre ces méthodes se situent plutôt au niveau des temps d'analyse ; conséquence directe du nombre de molécules séparées. Ainsi, les méthodes où seules la caféine et quelques dérivés sont séparés, présentent des temps d'analyse inférieurs à 10 min. (ARAMAKI et coll., 1991 ; TANIMURA, 1994). Mais lorsque l'ensemble des intermédiaires métaboliques (comprenant les dérivés méthylés de l'acide urique) sont étudiés, le temps d'analyse avoisine 60 min. (LELO et coll., 1989 ; BERTHOU et coll., 1989).

4.4. CONCLUSION

Au cours de ce chapitre, nous avons présenté la mise au point et l'amélioration de deux techniques chromatographiques d'analyse des méthylxanthines et d'une méthode d'extraction de ces composés.

La méthode par CLHP fait intervenir une méthode d'élution dite "par gradient" permettant une bonne séparation entre des molécules chimiquement proches, tout en évitant un allongement du temps d'analyse. Le calcul des concentrations des composés est réalisé à l'aide d'une technique d'étalonnage interne permettant de corriger des erreurs de dilution et de volume d'injection. La β -hydroxyéthylthéophylline a été préférée à la phénacétine comme étalon interne, car elle permet principalement de diminuer le temps d'analyse sans modifier les caractéristiques de la séparation.

Initialement, cette méthode a été appliquée à l'analyse des premiers intermédiaires de dégradation de la caféine au cours des cultures d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 sur différents milieux synthétiques à base de caféine. Par la suite, nous avons adapté cette méthode pour l'étude *in vitro* de la dégradation de cet alcaloïde par *Aspergillus* V12A25. Cependant, les analyses effectuées étaient souvent liées à une évaluation qualitative de l'activité enzymatique. Ceci nous a donc amené à développer une méthode d'analyse des méthylxanthines par CCM ; méthode jugée plus facile et plus rapide à mettre en œuvre que la méthode par CLHP.

Le solvant de migration mis au point pour l'analyse des méthylxanthines par CCM est le suivant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{PrOH}$ -2 90:8:7 (v/v/v). Il permet de séparer correctement toutes les méthylxanthines entre elles, sauf la 3-méthylxanthine et la 1-méthylxanthine. Cette restriction ne présente cependant pas un réel inconvénient pour la bonne visualisation de l'activité caféine déméthylase. On soulignera que la méthode par CCM permet de visualiser l'activité déméthylasique de 20 échantillons à la fois en 20 min. de migration, alors que dans le même temps, la méthode par CLHP ne permet d'analyser qu'un seul échantillon. Par ailleurs, la technique par CCM est assez sensible, le seuil de détection des méthylxanthines étant inférieur à 0,15 μg .

La mise au point d'une méthode d'extraction des méthylxanthines s'est avérée nécessaire lors des essais *in vitro* de dégradation de la caféine, car les faibles activités obtenues ne pouvaient être directement révélées par analyse en CCM. Nous avons déterminé qu'une double extraction de 30 sec. avec le système chloroforme/isopropanol 85:15 (v/v) permettait de récupérer 100 % de la caféine et de la théophylline. Ainsi, il est devenu possible de visualiser de faibles activités caféine déméthylase par concentration du principal produit de la réaction (la théophylline), tout en éliminant un maximum d'impuretés pouvant nuire à l'analyse qualitative en CCM, comme à l'analyse quantitative en CLHP.

**CARACTERISATION ET
IDENTIFICATION DES SOUCHES**

5. CARACTERISATION ET IDENTIFICATION DES SOUCHES

5.1. INTRODUCTION

Les deux souches *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25 ont été isolées au Mexique par ROUSSOS et coll. (1989) au cours d'une étude globale sur la valorisation des produits et sous-produits agricoles tropicaux, financée par la Communauté Européenne (projet STD 1). Dans le cas particulier de la pulpe de café, il s'agissait de pouvoir détoxifier celle-ci en cultivant sur ce substrat des champignons filamenteux capables de dégrader les substances antinutritionnelles et antiphysiologiques de la pulpe que sont la caféine et les polyphénols (BRESSANI, 1978).

Une première tentative d'identification sommaire des souches isolées a été réalisée par AQUIAHUATL (1992). Dans ce chapitre, l'identification des deux souches sauvages *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25 sera approfondie d'une manière classique, par la description et la comparaison de leurs caractères morphologiques à des souches de référence.

5.2. ETUDE MORPHOLOGIQUE DES SOUCHES

L'étude morphologique comprend les descriptions macroscopiques et microscopiques des souches *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25, observées après 7 jours de culture à 25°C sur différents milieux de référence (Malt Extract Agar, Czapek-Dox, Czapek Ycast Agar). Les caractéristiques obtenues dans ces conditions de culture standards, serviront à leur identification.

5.2.1. *Aspergillus* V12A25

5.2.1.1. Description macroscopique

La souche *Aspergillus* V12A25 cultivée sur milieu Malt Extract Agar (MEA) présente des colonies envahissantes, d'un diamètre de 8 cm après 7 jours d'incubation à 25°C. Ces colonies sont circulaires à bord régulier et légèrement aériennes (cotonneuses) sans être denses. Au centre de la boîte de Pétri, la colonie forme un cratère, recouvert des conidies les plus anciennes, de couleur ocre/marron. En allant vers le bord de la colonie, on observe une alternance de zones de fructification plus ou moins dense de couleur jaune/ocre, et enfin une petite couronne translucide de mycélium sans fructification (Figure 5.1-A). Sur ce milieu de culture, le champignon ne développe pas d'odeur particulière, et aucun exsudat n'est observé à la surface de la colonie. Enfin, la colonie apparaît blanchâtre au verso de la boîte de Pétri.

Sur milieu Czapek-Dox (CD), dans les mêmes conditions expérimentales, les colonies d'*Aspergillus* V12A25 atteignent un diamètre de 7 cm. Les caractéristiques générales des colonies sont identiques à celles décrites précédemment. Cependant, sur milieu CD, le mycélium est moins abondant et les fructifications sont moins nombreuses, plus claires (jaune/ocre), et deviennent marron en vieillissant (Figure 5.1-B).

5.2.1.2. Description microscopique

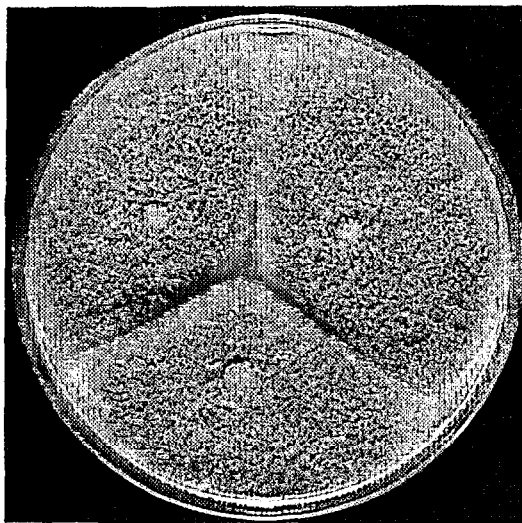
A partir des observations microscopiques, *Aspergillus* V12A25 (cultivé sur milieu CD) présente un mycélium translucide, septé, ramifié, rugueux et d'un diamètre compris entre 5 et 12 μm . Les formes de reproduction asexuées (conidiophores) sont terminées par des vésicules rondes à ovales, de 20 à 50 μm de diamètre (souvent inférieur à 40 μm), et généralement unisériées. A la surface des vésicules sont directement disposées les phialides. Celles-ci sont en forme de quille de 10 à 14 μm de longueur et de 5 à 8 μm de diamètre. Les phialides libèrent des conidies rondes, assez grosses (de 5 à 8 μm de diamètre), très ornementées, de couleur ocre/marron, et disposées en chaînettes assez longues.

5.2.2. *Penicillium* V33A25

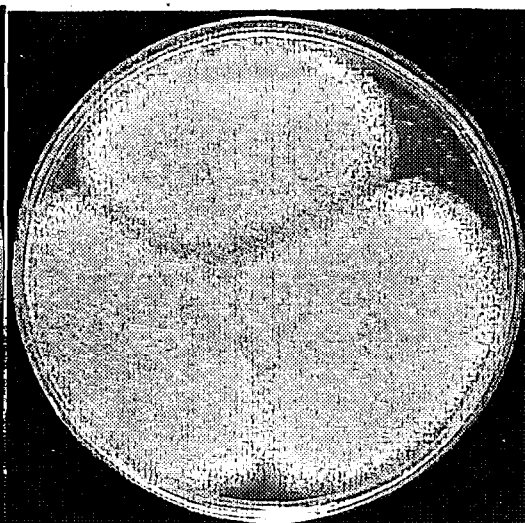
5.2.2.1. Description macroscopique

Après 7 jours de culture à 25°C sur milieu MEA, la souche *Penicillium* V33A25 donne des colonies atteignant un diamètre de 3,5 cm. Il s'agit de colonies moyennement aériennes, à bord assez régulier. La surface est homogène, recouverte de très nombreuses fructifications formant une croûte, ce qui donne une texture finement granuleuse (poudreuse). Le mycélium est peu dense et transparent. Les nombreuses fructifications apparaissent pigmentées en vert pistache pour les plus jeunes, à vert sombre pour les plus âgées (centre de la colonie). Enfin, une fine couronne de mycélium seul se dessine en périphérie (Figure 5.1-C). L'odeur qui se dégage de la culture est assez désagréable (odeur de bois moisi). Enfin, il n'y a pas formation d'exsudat en surface des colonies, ni de coloration de la gélose.

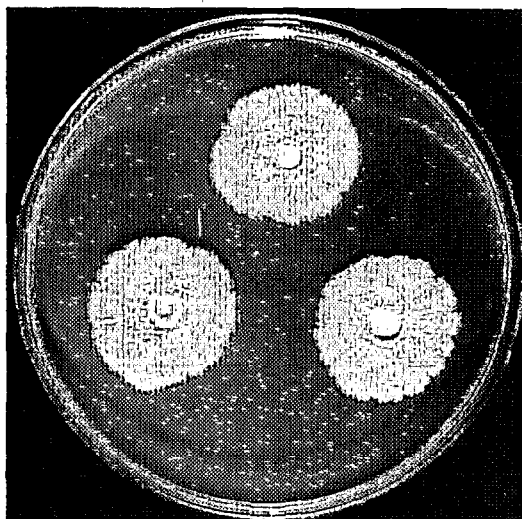
Dans les mêmes conditions de culture, on obtient sur milieu CD des colonies de 3,5 cm de diamètre. Le mycélium aérien de *Penicillium* V33A25 est ici moins dense que sur milieu MEA et présente peu de fructifications. Ces dernières sont situées uniquement au centre de la colonie, et sont de couleur vert pistache (Figure 5.1-D).



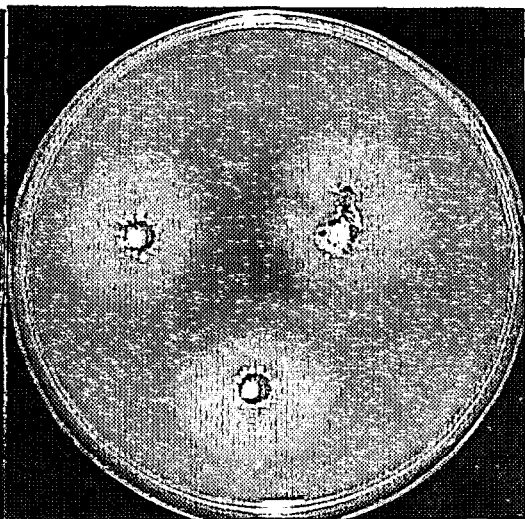
A. A12 sur Malt Extract Agar



B. A12 sur Czapek-Dox



C. P33 sur Malt Extract Agar



D. P33 sur Czapek-Dox

Figure 5.1 : Cultures de 7 jours à 25°C d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 sur milieux Malt Extract Agar et Czapek-Dox.

Sur le milieu Czapek Yeast Agar (CYA), les colonies ressemblent beaucoup à celles obtenues sur milieu MEA. Elles sont opaques et denses, d'un diamètre de 3,5 à 4 cm. On observe également l'aspect poudreux du mycélium aérien qui forme une croûte sur toute la surface de la colonie. Seule la couronne de mycélium jeune n'a pas développé de fructification. Par contre, la présence d'une pigmentation orangée visible au verso de la boîte de Pétri, est une caractéristique sur ce milieu que l'on ne retrouve pas dans les cultures sur milieu MEA.

5.2.2.2. Description microscopique

A partir des observations microscopiques, *Penicillium* V33A25 (cultivé sur milieu CD) présente un mycélium septé, ramifié, translucide, et d'un diamètre de 4 à 6 μm . Les formes de reproduction asexuées sont composées de conidiophores généralement triverticillés. Ceux-ci ont une paroi rugueuse, et portent des phialides en forme de quille de 3 à 3,5 μm de diamètre et de 7 à 14 μm de longueur. Ces phialides donnent naissance à des conidies de 4 à 5 μm de diamètre, vertes, rondes, et lisses, généralement disposées en courtes chaînes.

5.2.3. Identification des souches

L'appartenance des deux souches aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* avait déjà été déterminée par AQUIAHUATL et coll. (1988) puis confirmée par AQUIAHUATL (1992) et par DENIS (1992). Sur la base des données recueillies au cours de cette étude morphologique, nous avons tenté d'identifier les espèces auxquelles appartiennent ces deux champignons filamenteux. Pour cela, nous avons utilisé les clefs dichotomiques d'identification proposées par RAPER et FENNELL (1965) pour le genre *Aspergillus* (cf. annexe 2a), et par PITT (1979) pour le genre *Penicillium* (cf. annexe 2b).

Une prédominance chez *Aspergillus* V12A25 de têtes conidiennes unisériées, rayonnantes, et de couleur allant du jaune au marron, ainsi que des conidiophores translucides et rugueux, permettrait de classer cette souche dans le groupe des *Aspergillus flavus*. De plus, la présence de conidies très ornementées, semble rapprocher cette souche de l'espèce *Aspergillus tamarii*, selon la classification de RAPER et FENNELL (1965). Pourtant, certaines caractéristiques ne permettent pas d'écarter la possibilité d'être en présence d'une souche d'*Aspergillus oryzae* appartenant elle-même au groupe des *Aspergillus flavus*.

Pour *Penicillium* V33A25, les caractéristiques macroscopiques permettant son identification sont : des colonies de diamètre supérieur à 3 cm sur milieu Czapek Yeast Agar et inférieur à 4 cm sur milieu Malt Extract Agar ; une coloration orange au dos de la boîte pour les cultures sur CYA ; un aspect poudreux en surface des colonies sur milieu MEA. Les caractéristiques microscopiques sont : des stipes rugueux ; des penicilli avec au plus deux rami ; des conidies rondes, lisses et de couleur vert pistache à vert sombre. Ainsi, la souche *Penicillium* V33A25 pourrait correspondre à une souche de *Penicillium crustosum*, selon la classification de PITT (1979).

L'identification des champignons filamenteux est toujours très délicate à réaliser, parce qu'elle est basée sur des critères descriptifs, et reste donc soumise à une certaine subjectivité. Par ailleurs, les nombreux ouvrages bibliographiques prouvent la difficulté rencontrée par leurs auteurs à adopter une position commune sur la classification de ces microorganismes (AINSWORTH et coll., 1973 ; ALEXOPOULOS et MIMS, 1979 ; DOMSCH et coll., 1980 ; BOTTON et coll., 1985). C'est pourquoi l'identification qui a été réalisée au cours de cette étude, ne saurait être définitive, et devra être confirmée par plusieurs laboratoires experts.

5.3. CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES SUR MILIEUX GELOSES

5.3.1. Croissance apicale

La mesure de la croissance apicale est une donnée qui peut se révéler très intéressante, puisqu'elle constitue une caractéristique propre à chaque champignon dans des conditions données (SMITH et BERRY, 1975). Toutefois, il faut noter que la croissance apicale n'est pas forcément en corrélation avec le taux de croissance du microorganisme et avec la production de biomasse mycélienne, mais elle représente un bon indicateur d'envahissement d'un milieu solide par les champignons filamenteux (ROUSSOS et RAIMBAULT, 1982).

Les croissances apicales obtenues sur les milieux de référence Malt Extract Agar (MEA), Czapek Yeast Agar (CYA) et Potato Dextrose Agar (PDA) sont regroupées dans le tableau 5.1. Ces données sont comparées à celles obtenues antérieurement sur milieux Café Moulu-Saccharose (CMS) et Caféine-Saccharose (CS).

Tableau 5.1 : Croissances apicales d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 cultivés sur différents milieux gélosés à 25°C. Les croissances sont exprimées en mm par jour (moyennes et écart-types sur six répétitions)

Milieu Souche	MEA	CYA	PDA	CMS (DENIS, 1992)	CS (DENIS, 1992)
A12	7,4 (± 0,4)	7,6 (± 0,5)	5,8 (± 0,4)	4,0	3,6
P33	2,6 (± 0,1)	2,6 (± 0,1)	2,6 (± 0,1)	2,8	2,2

Malgré la différence de composition entre ces milieux de culture (cf. annexe 1), la souche *Penicillium* V33A25 présente sur chacun d'eux, une vitesse de croissance apicale similaire et proche de $2,6 \text{ mm.j}^{-1}$. Par contre, *Aspergillus* V12A25 se comporte différemment suivant les milieux de culture. Les croissances apicales de cette souche sont environ deux fois supérieures sur milieux MEA et CYA que sur milieux CMS et CS, contenant de la caféine. Il semble de ce fait qu'*Aspergillus* V12A25 soit plus affecté que *Penicillium* V33A25 par la présence de caféine dans le milieu de culture. La capacité de colonisation d'une surface par *Aspergillus* V12A25 reste néanmoins supérieure à celle de *Penicillium* V33A25, quelque soit le milieu considéré.

On remarquera que les vitesses de croissance apicale de ces deux souches sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par ROUSSOS (1985) pour d'autres souches de référence d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, cultivées sur des milieux similaires.

5.3.2. Indice de sporulation

L'indice de sporulation reflète la capacité d'un champignon filamenteux à produire des conidies, en fonction de la composition d'un milieu et dans des conditions de culture données. C'est un paramètre physiologique important, en particulier pour la présente étude où dans un souci d'homogénéité et de simplicité, tous les milieux de culture ont été inoculés avec des conidies.

Les milieux Café Moulu-Saccharose (CMS), Caféine-Saccharose (CS) et Caféine-Glucose (CG) ont été utilisés pour la production de conidies, car ils ont également été étudiés en tant que milieux de préculture (paragraphe 6.2.2.). Les taux de sporulation obtenus après 3 à 7 jours d'incubation à 25°C , sont reportés dans la figure 5.2.

Les deux milieux synthétiques utilisés (CS et CG) apparaissent plus intéressants pour la production d'importantes quantités de conidies que le milieu semi-synthétique (CMS). En effet, sur le milieu Café Moulu-Saccharose, les deux souches atteignent leur taux maximum de sporulation dès le troisième jour d'incubation ; alors que sur les deux autres milieux, la production de conidies se poursuit jusqu'au quatrième jour pour atteindre des valeurs maximales plus importantes. Ainsi, après 7 jours d'incubation, les taux de sporulation d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 sont respectivement 3 et 4,6 fois supérieurs sur les milieux CS et CG, que sur le milieu CMS. La limitation de la production de conidies sur le milieu Café Moulu-Saccharose est certainement due à la pauvreté de ce milieu, notamment en glucides.

Par ailleurs, la souche *Aspergillus* V12A25 produit 4 à 6 fois moins de conidies par unité de surface que la souche *Penicillium* V33A25, selon le milieu de culture et le temps d'incubation considérés. Ce phénomène avait également été observé sur milieu Potato Dextrose Agar (exempt de caféine) mais dans une moindre mesure (DENIS, 1992). Outre les variations physiologiques pouvant exister entre les deux souches vis-à-vis de la présence de caféine dans les milieux de culture, les différences d'indices de sporulation entre les deux champignons sont également liées à leurs caractéristiques morphologiques propres comme la disposition dans l'espace des structures reproductrices et la taille des conidies (ROUSSOS et coll., 1991).

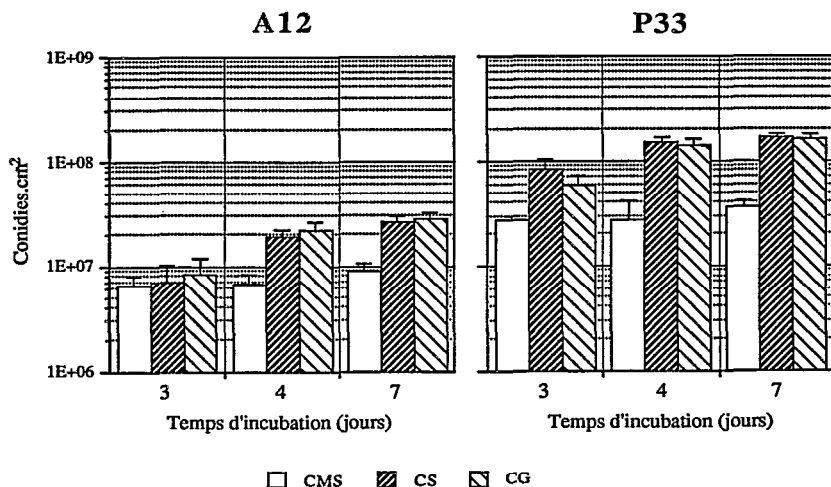


Figure 5.2 : Indices de sporulation d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 cultivés sur différents milieux, après 3, 4 ou 7 jours d'incubation à 25°C. Les indices de sporulation sont exprimés en nombre de conidies produites par cm² (moyennes et écart-types sur trois répétitions).

5.4. CONCLUSION

La description morphologique des souches *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25 a été réalisée à partir de cultures sur différents milieux gélosés, couramment employés en mycologie pour l'étude taxonomique des champignons filamenteux.

Par la suite, nous avons tenté d'identifier ces souches au niveau de l'espèce, sur la base des caractéristiques morphologiques établies, et à l'aide de clefs dichotomiques d'identification. La souche *Aspergillus* V12A25 appartiendrait au groupe des *Aspergillus flavus*. Il pourrait s'agir plus précisément d'une souche d'*Aspergillus tamarii*, ou d'une souche d'*Aspergillus oryzae* (d'après RAPER et FENNELL, 1965). Quant à la souche *Penicillium* V33A25, elle pourrait être identifiée comme étant une souche de *Penicillium crustosum* (d'après PITT, 1979).

L'étude de la croissance apicale et de l'indice de sporulation ont montré qu'*Aspergillus* V12A25 envahit rapidement la surface du milieu de culture sur lequel il se développe en donnant peu de conidies. Par contre, *Penicillium* V33A25 présente un comportement inverse.

Les milieux contenant de la caféine (1 g.l^{-1}) ne semblent pas affecter la croissance apicale de *Penicillium* V33A25. Par contre, *Aspergillus* V12A25 apparaît plus sensible vis-à-vis de cet alcaloïde. L'effet de la caféine sur la croissance sera plus précisément discuté lors de l'étude de l'influence de la concentration initiale en caféine sur la physiologie des souches cultivées en milieux liquides (chapitre 6).

Enfin, la conidiogenèse d'*Aspergillus* V12A25 et celle de *Penicillium* V33A25 ne sont pas inhibées par la caféine. Les indices de sporulation obtenus sur tous les milieux contenant de la caféine sont suffisants pour assurer une inoculation correcte des différents milieux de culture (volume d'inoculum inférieur à 5 % v/v). Aucune étude de stabilité du caractère "dégradation de la caféine" n'ayant été entreprise, l'utilisation de milieux contenant de la caféine comme milieux de préculture s'est donc imposée, afin de garantir le maintien de ce caractère original chez les deux souches.

PHYSIOLOGIE D'*Aspergillus* V12A25
ET DE *Penicillium* V33A25
CULTIVES SUR CAFEINE

6. PHYSIOLOGIE D'*Aspergillus* V12A25 ET DE *Penicillium* V33A25 CULTIVES SUR CAFEINE

6.1. INTRODUCTION

La physiologie des champignons filamenteux correspond à l'étude des fonctions organiques qui régissent le maintien et le développement de ces microorganismes par rapport à des conditions environnementales données (ROUSSOS et PERRAUD-GAIME, 1995). Elle se traduit par des caractéristiques d'ordres morphologiques (germination des conidies, croissance apicale, conidiogénèse) et biochimiques (métabolismes primaire et secondaire).

Dans ce chapitre, nous allons étudier l'influence de divers paramètres environnementaux sur la physiologie d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25, afin de maîtriser et d'optimiser la dégradation de la caféine par ces deux champignons. Les critères qui permettront de fixer les niveaux d'utilisation des paramètres de culture sont (paragraphe 3.10.2.) :

- l'optimisation des vitesses maximales et moyennes de dégradation de la caféine,
- l'obtention d'un mycélium homogène et sans fructification,
- l'optimisation de la production de biomasse,
- l'absence de production de pigments.

Ces critères ont également été fixés en prévision de l'étude biochimique de la dégradation de la caféine (chapitre 7). En effet, nous nous sommes appuyés sur l'hypothèse qu'un champignon qui dégrade rapidement la caféine en produisant une biomasse importante sous forme végétative uniquement, oriente une importante partie de son métabolisme général vers la dégradation de ce substrat d'une part, et vers la seule production de biomasse d'autre part. Dans ces conditions, la production d'enzymes impliquées dans la voie de dégradation de la caféine devrait être maximale. Afin d'accentuer ce phénomène, nous avons choisi d'utiliser un milieu de culture synthétique ne contenant que de la caféine comme source d'azote ; combiné à une source de carbone facilement assimilable par les champignons.

6.2. INFLUENCE DES PARAMETRES DE CULTURE

Les effets de trois paramètres de culture sur la physiologie des deux souches sélectionnées ont été étudiés lors de travaux préliminaires (DENIS, 1992). Il s'agissait du pH initial, de la concentration en saccharose et du taux d'inoculation.

Cette étude a permis de dégager les conclusions suivantes :

- les deux champignons filamenteux sont capables de se développer dans un milieu liquide synthétique contenant de la caféine comme unique source d'azote. Par contre, en absence de source de carbone leurs conidies ne germent pas.
- pour un pH initial compris entre 4 et 7, les vitesses de dégradation de la caféine de chacune des deux souches restent identiques. Mais un pH initial acide permet d'éviter la production de pigments dans le milieu.
- pour une concentration en saccharose comprise entre 5 et 30 g.l⁻¹, et une concentration en caféine de 1 g.l⁻¹, les vitesses de dégradation de la caféine de chacune des deux souches restent identiques. Mais plus la teneur initiale en saccharose est élevée, plus la biomasse produite augmente.
- la caféine est plus rapidement dégradée lorsque le taux d'inoculation augmente (passant de 10⁵ à 10⁶ conidies.ml⁻¹).

Les résultats de ces travaux préliminaires nous ont donc permis de fixer dès le début de la présente étude, les conditions de culture suivantes : pH initial de 4, concentration élevée en source carbonée (rapport C/N de 50), taux d'inoculation de 10⁶ conidies.ml⁻¹.

6.2.1. Température d'incubation

La température fait partie des facteurs environnementaux les plus importants pouvant influencer le développement des champignons filamenteux (AINSWORTH et SUSSMAN, 1965 ; ONIONS et coll., 1981 ; SMITH, 1994). La température optimale de croissance est intimement liée à la souche elle-même, aux conditions de culture (nutritionnelles et physiques) et enfin à l'application recherchée (AINSWORTH et SUSSMAN, 1965 ; SMITH, 1994). Il est alors possible que les températures optimales de croissance d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 cultivés sur un milieu non conventionnel (où la caféine représente l'unique source azotée), soient différentes de celles généralement admises pour la culture de ces champignons filamenteux.

Nous avons testé des températures d'incubation de 25, 30 et 35°C, car les deux températures extrêmes avaient été utilisées lors d'une étude préliminaire de ces souches (AQUIAHUATL et coll., 1988). Par ailleurs, cette plage de température est généralement citée comme étant optimale pour la culture des champignons filamenteux.

Les cultures des champignons filamenteux ont été réalisées en milieu Caféine-Glucose. Ce milieu a été inoculé avec des conidies provenant d'une préculture sur milieu gélosé Café Moulusaccharose (paragraphe 3.3.). Les productions finales de biomasse ainsi que les vitesses maximales et moyennes de dégradation de la caféine ont été déterminées à partir des cinétiques de croissance des microorganismes et de dégradation de la caféine. Pour chacune des deux souches, ces données ont été reportées en fonction de la température d'incubation (Figure 6.1). Un tracé de courbes polynomiales d'ordre 2 a été réalisé pour chacun des paramètres étudiés.

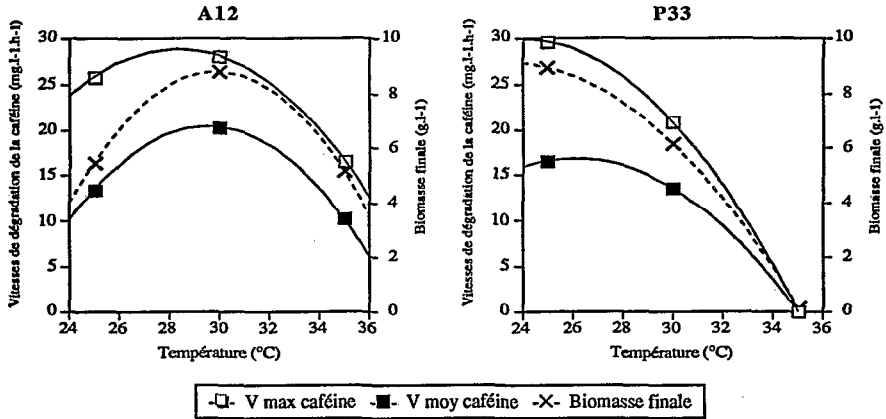


Figure 6.1 : Cultures d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 en milieu CG à différentes températures d'incubation. Evolutions des vitesses de dégradation de la caféine et des biomasses finales en fonction de la température d'incubation.

- Effet de la température sur la souche *Aspergillus* V12A25 (Figure 6.1-A12) :

A une température d'incubation de 30°C, *Aspergillus* V12A25 dégrade la totalité de la caféine en 50 heures. A 25 et 35°C, il lui faut respectivement 15 heures et 40 heures de plus pour éliminer toute la caféine ; ce qui diminue les vitesses moyennes de dégradation. Les biomasses finales obtenues à ces deux températures sont environ 1,7 fois moins importantes que celles obtenues dans le cas d'une culture à 30°C. Par ailleurs, à 35°C, on note une forte diminution de la vitesse maximale de dégradation de la caféine. Parallèlement, des formes de reproduction asexuée apparaissent dès la 25ème heure de culture, alors que les sources d'azote et de carbone ne sont pas épuisées. Ces deux dernières observations indiquent que les conditions de culture deviennent très limitantes pour *Aspergillus* V12A25, lorsqu'il est cultivé à 35°C.

La température optimale de croissance d'*Aspergillus* V12A25 est donc proche de 30°C, lorsque cette souche est cultivée dans un milieu à base de caféine comme unique source d'azote. Ce microorganisme semble plus particulièrement affecté pour des températures supérieures.

- Effet de la température sur la souche *Penicillium* V33A25 (Figure 6.1-P33) :

A une température d'incubation de 35°C, les conidies de *Penicillium* V33A25 ne germent pas, même après quatre jours d'incubation. Il faut plus de 65 heures d'incubation à 30°C contre seulement 55 heures à 25°C, pour que le champignon dégrade toute la caféine. Les biomasses finales obtenues sont alors de 6,2 et 8,9 g.l⁻¹ respectivement.

Afin de mieux cerner la plage de températures optimales de croissance, comme dans le cas d'*Aspergillus*, il aurait été intéressant de tester une température d'incubation plus basse pour *Penicillium* V33A25. Malgré ce manque de résultat, il semble qu'une température d'incubation de 25°C soit satisfaisante à un bon développement de cette souche dans un milieu à base de caféine comme unique source d'azote. Une température d'incubation de 20°C sera testée pour cette souche lors de l'étude finale de l'effet des conditions de culture sur la physiologie des deux champignons (paragraphe 6.3.).

En conclusion, les températures optimales de croissance obtenues pour *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25, cultivés sur un milieu à base de caféine comme unique source d'azote, sont proches de 30°C et de 25°C respectivement. Ces températures seront utilisées pour la suite de ces travaux. Elles correspondent aux plages de températures généralement admises dans la littérature pour ces deux genres de champignons filamenteux (paragraphe 2.3.1.). ONIONS et coll. (1981) mentionnent entre autres que la plupart des espèces appartenant au genre *Penicillium* ont des températures optimales de croissance comprises entre 20 et 25°C, alors que les espèces appartenant au genre *Aspergillus* se développent préférentiellement à 30°C.

6.2.2. Milieu de préculture et nature de la source de carbone

Les conditions de préculture conditionnent l'état physiologique des conidies utilisées pour l'inoculation des milieux de culture. De ce fait, il est souvent recommandé de choisir des milieux identiques pour la préculture et la culture d'un microorganisme afin de limiter les perturbations dues au changement d'environnement. Nous avons montré au paragraphe 5.3.2. que la production de conidies d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 en surface d'un milieu gélosé, est plus importante sur les deux milieux synthétiques Caféine-Saccharose (CS) et Caféine-Glucose (CG) que sur le milieu semi-synthétique Café Moulu-Saccharose (CMS). Dans la présente étude, nous allons vérifier leur efficacité en tant que milieux de préculture, pour la croissance des champignons filamenteux cultivés en milieux liquides synthétiques. Cette étude permettra également de déterminer, entre le glucose et le saccharose, la source de carbone la plus adaptée à chacun des deux microorganismes.

Nous avons réalisé en parallèle des précultures sur milieux CMS et CG gélosés, suivies de cultures en milieu CG liquide, et des précultures sur milieux CMS et CS gélosés, suivies de cultures en milieu CS liquide. Les cinétiques de production de biomasse et de dégradation de la caféine sont reportées dans la figure 6.2. Le tableau 6.1 regroupe les principaux résultats issus de ces essais.

6.2.2.1. Résultats expérimentaux

Pour *Aspergillus* V12A25, les précultures sur milieu Café Moulu-Saccharose améliorent les vitesses maximales de dégradation de la caféine indépendamment de la nature de la source de carbone présente dans le milieu de culture (Figure 6.2-C). Parallèlement, les vitesses moyennes augmentent grâce à une diminution du temps de latence précédant la dégradation de la caféine, et à un développement plus rapide du champignon (Figure 6.2-A et Tableau 6.1).

D'autre part, la culture d'*Aspergillus* sur saccharose semble préférable à celle sur glucose, car le rendement en biomasse est dans ce cas plus important et la vitesse maximale de dégradation de la caféine est légèrement supérieure (Tableau 6.1). Enfin, la croissance d'*Aspergillus* V12A25 est plus rapide dans les milieux contenant du saccharose (Figure 6.2-A).

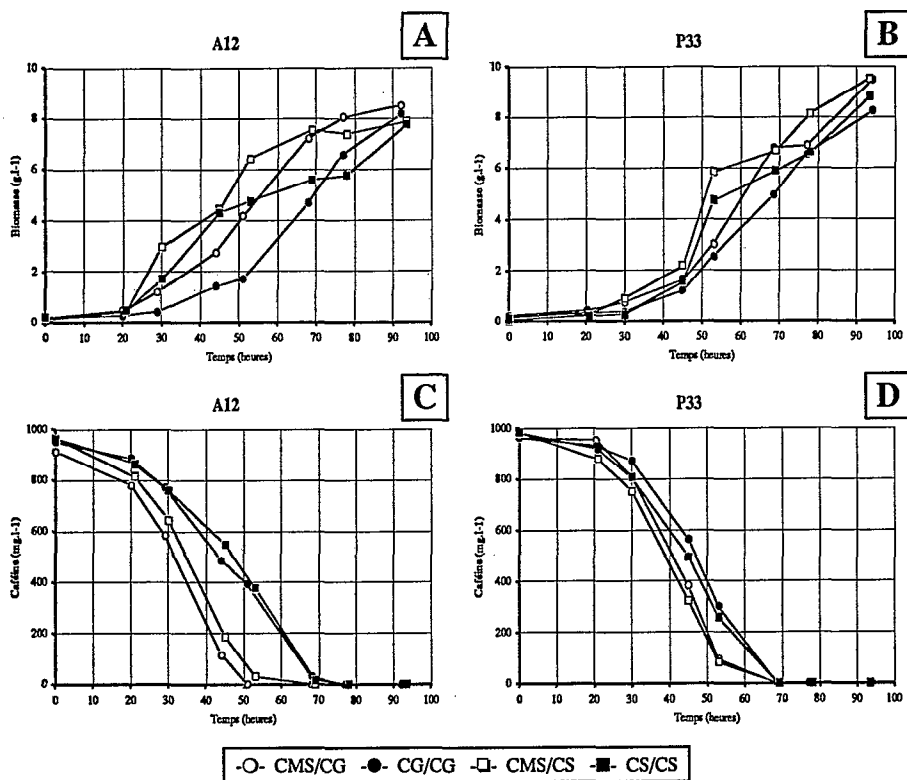


Figure 6.2 : Cultures d'*Aspergillus* V12A25 (A et C) et de *Penicillium* V33A25 (B et D) en milieux liquides CG et CS, avec précultures sur milieux gélosés CMS, CG ou CS. Evolutions de la biomasse (A et B) et de la dégradation de la caféine (C et D).

Tableau 6.1 : Bilan des cultures d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25, précultivés et cultivés sur différents milieux, à 30 et 25°C respectivement.

Souche	Milieux de Préculture (tps d'incub.)	Milieux de Culture (tps final)	Consom. sucres tot. (g.l ⁻¹)	Production de biomasse (g.l ⁻¹)	Y _{X/S}	V _{max} Caféine (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	V _{moy} Caféine (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)
A12	CMS (7 j.)	CS (93 h.)	16,5	7,8	0,47	35,2	17,5
	CS (4 j.)	CS (93 h.)	15,8	7,6	0,48	22,3	13,8
	CMS (7 j.)	CG (92 h.)	27,9	8,3	0,30	31,1	19,8
	CG (4 j.)	CG (92 h.)	23,4	8,0	0,34	21,4	13,6
P33	CMS (7 j.)	CS (93 h.)	nd *	9,5		29,1	17,5
	CS (4 j.)	CS (93 h.)	21,5	8,8	0,41	29,5	15,8
	CMS (7 j.)	CG (94 h.)	22,8	9,3	0,41	30,7	17,2
	CG (4 j.)	CG (94 h.)	19,0	8,1	0,43	33,1	15,4

* nd : non déterminé

Pour *Penicillium* V33A25, quelques soient les conditions de préculture, les différences entre les vitesses maximales de dégradation de la caféine des quatre cultures sont peu significatives (Figure 6.2-D et Tableau 6.1). On remarque seulement que les temps de latence précédant la dégradation de la caféine diminuent, lorsque le milieu Café Moulu-Saccharose est utilisé pour la production de l'inoculum (Figure 6.2-D). Ceci permet d'augmenter légèrement les vitesses moyennes de dégradation de la caféine (Tableau 6.1).

Pour les deux microorganismes, on a noté que le milieu de préculture influence les premiers stades de développement mycélien. Ainsi, lorsque les mêmes milieux sont utilisés pour la préculture et la culture, les conidies se regroupent pendant la phase de germination, et forment par la suite de gros agrégats mycéliens, plus importants en taille que les pelotes obtenues dans les cultures avec préculture en CMS. Les échanges microorganisme/milieu sont dans ce cas plus limités, ce qui empêche la croissance optimale des champignons. Ce phénomène est plus prononcé pour les cultures en Caféine-Glucose que pour celles en Caféine-Saccharose. Pour pallier à ce phénomène d'agrégation cellulaire, une agitation vigoureuse à l'aide d'une pipette Pasteur a systématiquement été réalisée afin d'homogénéiser le plus possible les milieux de culture.

Enfin, la nature de la source de carbone a une incidence sur le développement des formes de reproduction asexuée :

- pour *Aspergillus* V12A25, dans la culture en Caféine-Glucose précédée d'une préculture dans le même milieu, une fructification abondante apparaît après 48 heures d'incubation. Dans tous les autres cas, la conidiogenèse n'apparaît qu'à partir de 72 heures d'incubation.

- pour *Penicillium* V33A25, quelque soit le milieu de préculture, aucune conidiogenèse n'apparaît dans les cultures contenant du saccharose. Par contre, cultivé en milieu contenant du glucose, ce champignon développe ses premières formes de fructification dès 30 heures d'incubation.

6.2.2.2. Discussion

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus permettent d'affirmer que le milieu Café Moulusaccharose (CMS) est mieux adapté que les milieux Caféine-Saccharose (CS) et Caféine-Glucose (CG) pour la préculture des deux souches de champignons filamenteux. On peut supposer que la composition plus complexe du milieu CMS est à l'origine de ce phénomène. Il est en effet possible que les conidies produites sur ce milieu présentent un pool enzymatique plus adapté, et un meilleur état physiologique général au moment de leur utilisation que celles produites sur les milieux CS et CG, entièrement synthétiques.

L'action bénéfique du milieu CMS peut également résulter de la technique d'ensemencement des milieux de culture. En effet, puisqu'aucun "lavage" des conidies récoltées n'est réalisé avant inoculation, divers éléments issus du milieu comme du mycélium lui-même sont de ce fait introduits, en faibles quantités, dans les milieux de culture. Il est donc possible que certains éléments traces facilitant la germination des conidies ou la croissance des champignons soient fournis uniquement par le milieu CMS. Pour vérifier cette hypothèse, il aurait été intéressant de procéder à des essais où les conidies auraient été préalablement lavées avant d'être introduites dans les milieux de culture. ROUSSOS (1985) a en effet montré que le lavage de conidies d'un champignon cellulolytique (*Trichoderma harzianum*) produites sur un milieu à base de cellulose comme unique source de carbone, ne permet plus la germination de ces dernières dans le même milieu de culture ; contrairement aux conidies non lavées. Néanmoins, une fois lavées, les conidies de *Trichoderma harzianum* germent toujours dans un milieu à base de glucose.

Les résultats obtenus avec *Penicillium* V33A25 sont très comparables à ceux obtenus par SCHWIMMER et KURTZMAN (1972). Ces auteurs ont étudié une souche de *Penicillium crustosum* cultivée dans un milieu semi-synthétique à base d'infusion de café et de saccharose, en utilisant comme inoculum du mycélium et non des conidies. Ils ont montré qu'une préculture dans ce même milieu, ou dans un milieu synthétique à base de caféine et de saccharose, ne présente aucune conséquence sur les vitesses maximales de dégradation de la caféine obtenues dans le milieu de culture. Par contre, l'initialisation de la dégradation de l'alcaloïde est plus rapide si le microorganisme est précultivé dans le milieu à base d'infusion de café. Enfin, ces auteurs ont montré que la caféine disparaît légèrement plus rapidement du milieu de culture, lorsque du saccharose est ajouté à l'infusion de café, plutôt que du glucose.

Dans le cas des cultures d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25, l'effet de la nature de la source de carbone est également peu marqué en ce qui concerne les vitesses de dégradation de la caféine. Par contre, la biomasse est produite plus rapidement en milieu Caféine-Saccharose qu'en milieu Caféine-Glucose (Figure 6.2-A et B). Parallèlement, la présence de saccharose limite la formation de conidies, contrairement à celle du glucose. Dans notre cas, ceci est souhaitable pour la production de mycélium, en vue d'une analyse de son contenu intracellulaire.

En conclusion de cette analyse comparative, les milieux de préculture et de culture retenus pour la suite des travaux, ont été respectivement le milieu gélosé Café Moulu-Saccharose et le milieu liquide Caféine-Saccharose.

6.2.3. Effet de la concentration initiale en caféine

Les microorganismes cités dans la littérature comme étant capables de métaboliser la caféine présentent des plages de tolérance à ce composé assez variables. Quelques auteurs ont cherché à isoler des microorganismes moins sensibles aux effets toxiques de la caféine, en adaptant leurs souches à des concentrations de plus en plus élevées en caféine (WOOLFOLK, 1975).

Au cours d'une étude préliminaire, il a été démontré que les souches *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25 étaient capables de croître sur milieu Caféine-Saccharose gélosé contenant des concentrations en caféine allant jusqu'à 20 g.l⁻¹ (DENIS, 1992). Leurs vitesses de croissance apicale étaient alors fortement réduites. Dans l'étude qui suit, cette expérience est reprise et réalisée en milieu CS liquide. Elle nous permettra de déterminer le seuil de tolérance à la caféine de chacune des deux souches, ainsi que leurs optima de croissance sur un milieu contenant de la caféine. L'effet toxique de l'alcaloïde sur d'éventuels changements des caractères morpho-physiologiques des champignons, sera également étudié.

Pour cela, des cultures en milieux Caféine-Saccharose où seule la concentration initiale en caféine a varié de 0,1 à 50 g.l⁻¹, ont été réalisées. Les courbes de croissance des microorganismes et de dégradation de la caféine sont présentées dans la figure 6.3. Les vitesses maximales de production de biomasse et de dégradation de la caféine issues de ces courbes ont été reportées en fonction de la quantité initiale en caféine, sur la figure 6.4.

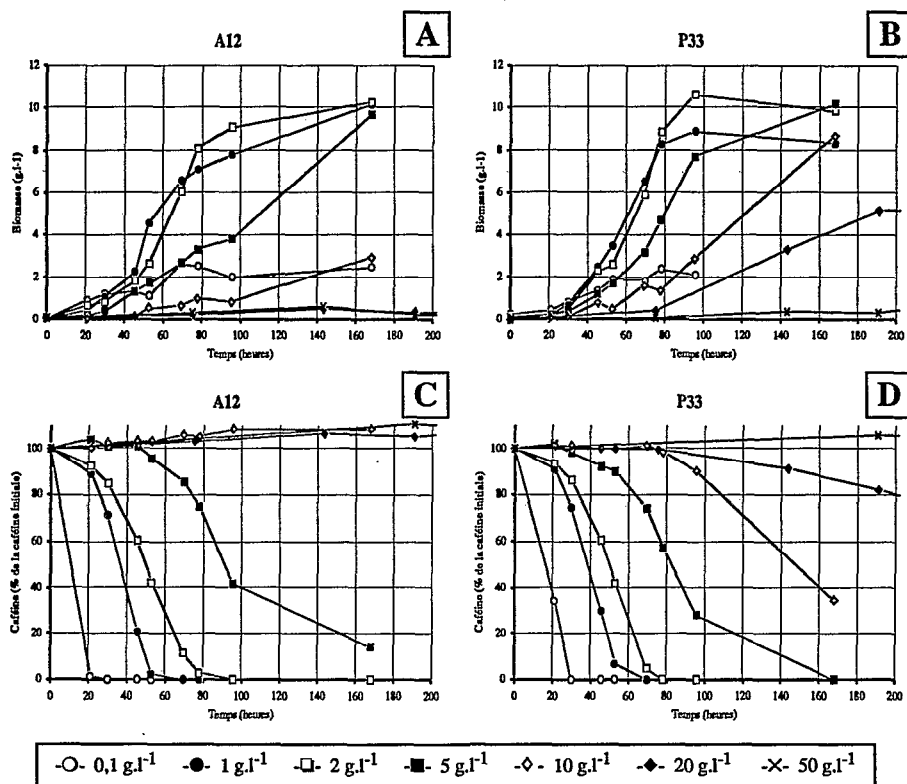


Figure 6.3 : Cultures d'*Aspergillus* V12A25 (A et C) et de *Penicillium* V33A25 (B et D), en milieu CS contenant différentes concentrations initiales en caféine. Evolutions de la biomasse (A et B) et de la dégradation de la caféine (C et D).

6.2.3.1. Résultats expérimentaux

- Effets sur la dégradation de la caféine et la production de biomasse

Pour des concentrations initiales en caféine inférieures ou égale à 5 g.l⁻¹ dans les milieux de culture, les vitesses de dégradation de la caféine sont similaires pour les deux souches (Figure 6.4-A). L'augmentation de la teneur en caféine jusqu'à 5 g.l⁻¹ permet d'accroître les vitesses maximales de dégradation jusqu'à 85 mg.l⁻¹.h⁻¹ en moyenne. Au-delà de cette concentration, les souches présentent des comportements différents (Figure 6.4-A).

Aspergillus V12A25 devient rapidement incapable de dégrader la caféine et de se développer (Figure 6.3-A et C). Par contre, *Penicillium* V33A25 résiste mieux aux effets de l'alcaloïde (Figure 6.3-B et D). La vitesse de dégradation de la caféine de cette souche diminue progressivement à partir de 5 g.l⁻¹ de caféine initiale, pour devenir nulle à 50 g.l⁻¹ (Figure 6.3-C).

La comparaison des cinétiques de dégradation (Figure 6.3-C et D), montre que plus la teneur initiale en caféine augmente, plus le temps de latence vis-à-vis de sa dégradation est accru. Ceci démontre la difficulté des deux souches à se développer à de fortes concentrations en caféine.

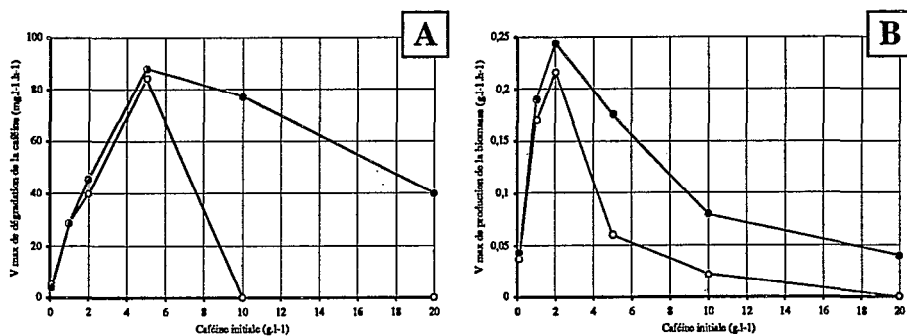


Figure 6.4 : Cultures d'*Aspergillus* V12A25 (O) et de *Penicillium* V33A25 (●), en milieu CS. Vitesses maximales de dégradation de la caféine (A) et de production de biomasse (B) en fonction de la concentration initiale en caféine.

En ce qui concerne la croissance mycélienne, on observe que la durée de la phase de latence augmente en fonction de la concentration initiale en caféine dans le milieu de culture (Figure 6.3-A et B). Le phénomène est surtout marqué pour une concentration supérieure ou égale à 10 g.l⁻¹. Parallèlement, plus la concentration en alcaloïde augmente, plus le pourcentage de germination des conidies diminue. Finalement, les conidies ne germent plus, même après 8 jours d'incubation, pour une teneur en caféine de 20 g.l⁻¹ pour *Aspergillus* et de 50 g.l⁻¹ pour *Penicillium*.

L'évolution des vitesses maximales de production de biomasse est similaire pour les deux souches, et présente un maximum à 2 g.l⁻¹ de caféine initiale (Figure 6.4-B). Cependant, les biomasses maximales sont obtenues pour des concentrations initiales en caféine comprises entre 1 et 10 g.l⁻¹ pour *Penicillium* V33A25 (Figure 6.3-B) et entre 1 et 5 g.l⁻¹ pour *Aspergillus* V12A25 (Figure 6.3-A). On notera que pour ces mêmes valeurs, la teneur en saccharose (source de carbone et d'énergie) n'a pas été limitante durant les quatre premiers jours de culture (Tableau 6.2). De plus, la consommation de saccharose est la plus rapide pour les essais à 2 g.l⁻¹ de caféine initiale.

Tableau 6.2 : Cultures d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 en milieux CS à 1, 2, 5 ou 10 g.l⁻¹ de caféine initiale. Teneurs en sucres totaux résiduels (g.l⁻¹) après 3, 4 et 7 jours d'incubation (Saccharose initiale = 29,4 g.l⁻¹).

Souche	Temps d'incub. (j.)	Caféine initiale (g.l ⁻¹)			
		1	2	5	10
A12	3	10,4	9,3	21,5	nd *
	4	9,4	4,2	19,8	26,5
	7	0,2	0,1	0,2	24,3
P33	3	8,9	5,6	16,4	21,0
	4	4,1	0,8	6,8	18,5
	7	0,3	0,3	0,2	0,4

* nd : non déterminé

- Effet sur la morphologie et la conidiogenèse des champignons

L'augmentation de la concentration en caféine du milieu de culture se traduit également par des changements morphologiques. Les plus importants concernent la souche *Aspergillus* V12A25, dont le mycélium devient trapu, et à septa rapprochés, à partir de 5 g.l⁻¹ de caféine (Figure 6.5-D). Pour la souche *Penicillium* V33A25, on note seulement qu'à partir de cette même concentration, le mycélium forme des ondulations (Figure 6.5-B).

Une conidiogenèse importante apparaît chez *Aspergillus* V12A25 après épuisement de la source d'azote dans les cultures à 0,1, 1 et 2 g.l⁻¹ de caféine initiale (Figure 6.5-E). Pour la culture à 5 g.l⁻¹, une fructification est observable en fin de culture. Les structures reproductrices sont alors peu caractéristiques : les conidiophores sont courts et les têtes aspergillaires sont constituées de quelques phialides par vésicule. Pour *Penicillium* V33A25, une importante conidiogenèse apparaît seulement dans la culture à 0,1 g.l⁻¹ de caféine initiale, après épuisement de celle-ci. Quelques fructifications se forment également dans les cultures à 1 et 2 g.l⁻¹ de caféine au 7ème jours d'incubation uniquement.

Il apparaît donc clairement que la caféine agit à tous les stades de développement des champignons filamenteux (germination des conidies, croissance apicale et conidiogenèse). Les modifications morphologiques sont généralement accentuées avec l'augmentation de la teneur en caféine dans le milieu de culture. Elles peuvent s'expliquer soit par un phénomène d'autodéfense des microorganismes luttant contre les fortes concentrations en caféine, soit par un effet direct de la caféine, entraînant notamment un dérèglement dans le développement des structures membranaires (effet mutagène de la caféine ; paragraphe 2.1.4.3.).

6.2.3.2. Discussion

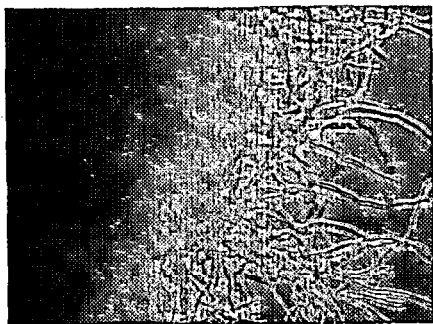
Les optima de croissance des deux souches cultivées en milieu liquide sur caféine comme unique source d'azote semblent donc compris entre 2 et 5 g.l⁻¹ de caféine initiale. Dans ces conditions, le rapport C_{sacc}/N_{caf} du milieu de culture est compris entre 25 et 10.

La souche *Aspergillus* V12A25 apparaît plus sensible aux effets de la caféine que la souche *Penicillium* V33A25, dont la physiologie semble mieux adaptée à la dégradation de la caféine. Ainsi, le seuil de toxicité "absolu" (germination et croissance nulles) se situe entre 10 et 20 g.l⁻¹ de caféine pour *Aspergillus* V12A25, contre 20 et 50 g.l⁻¹ pour *Penicillium* V33A25. L'effet toxique de l'alcaloïde est toutefois observable chez les deux souches pour une concentration en caféine de 5 g.l⁻¹, et se traduit par des modifications morphologiques, très remarquables chez *Aspergillus*.

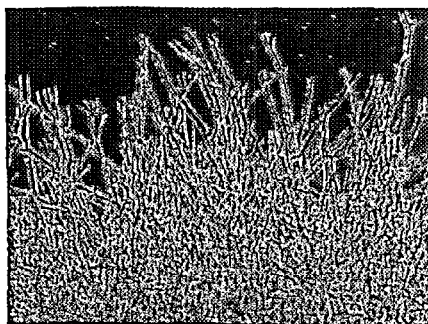
Pour des teneurs inférieures à 5 g.l⁻¹ les deux champignons présentent des comportements identiques : ils dégradent la caféine et se multiplient avec des vitesses similaires. On notera cependant qu'*Aspergillus* V12A25 présente une vitesse moyenne de dégradation de la caféine supérieure à celle de *Penicillium* V33A25 pour la plus faible des concentrations en alcaloïde testées. Ceci est probablement dû à une germination plus rapide de cette souche et donc à un temps de latence vis-à-vis de la consommation de caféine, moins important.

D'autres souches de champignons filamenteux citées dans la littérature présentent des comportements similaires. Comparativement, la souche *Penicillium* V33A25 apparaît particulièrement performante et très résistante aux effets de la caféine. SCHWIMMER et coll. (1971) ont montré qu'une souche de *Penicillium roquefortii* cultivée dans des conditions très similaires à celles utilisées dans notre étude, présente un optimum de production de biomasse à une concentration initiale en caféine de l'ordre de 1,6 g.l⁻¹. La croissance de ce champignon devient nulle pour une concentration en caféine de 40 g.l⁻¹. Cultivée dans un milieu à base de caféine à 2 g.l⁻¹ et de saccharose à 30 g.l⁻¹, cette même souche présente une vitesse maximale de dégradation de la purine et une biomasse finale proches des valeurs obtenues pour *Penicillium* V33A25 (KURTZMAN et SCHWIMMER, 1971 ; SCHWIMMER et coll., 1971). Par contre, la souche de *Penicillium crustosum* étudiée par SCHWIMMER et KURTZMAN (1972), est moins efficace pour dégrader la caféine. En effet, cultivée dans les mêmes conditions, sa vitesse maximale de dégradation n'est que de 12 mg.l⁻¹.h⁻¹.

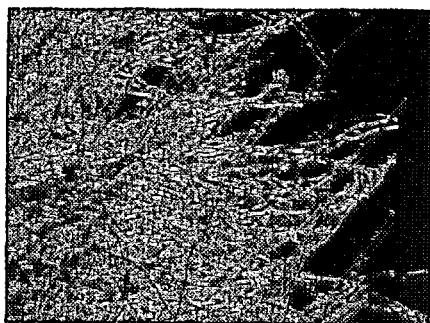
TSUBOUCHI et coll. (1985) ont plus récemment isolé une souche d'*Aspergillus ochraceus* capable de se développer dans un milieu complexe à base d'extrait de levure et de saccharose, contenant jusqu'à 10 g.l⁻¹ de caféine. Dans ces conditions, le champignon dégrade entièrement cette purine en 10 jours environ. Néanmoins, les auteurs n'ont pas démontré si *A. ochraceus* était capable d'utiliser la caféine comme unique source d'azote.



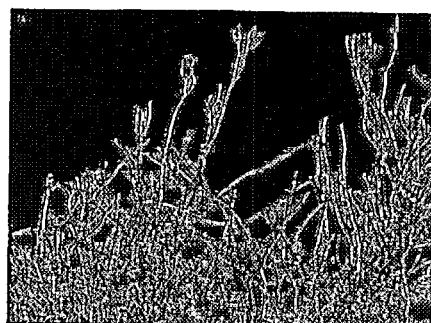
A. P33 CS 1 g.l⁻¹ (x 100)



B. P33 CS 5 g.l⁻¹ (x 100)



C. A12 CS 1 g.l⁻¹ (x 100)



D. A12 CS 5 g.l⁻¹ (x 100)



E. A12 CS 1 g.l⁻¹ (x 400)

Figure 6.5 : Vues au microscope optique d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 cultivés en milieux CS à 1 et 5 g.l⁻¹ de caféine initiale, après 3 jours d'incubation.

On retrouve également des niveaux de résistance à la caféine différents chez d'autres microorganismes. La souche de *Pseudomonas putida* isolée par BLECHER et LINGENS (1977) présente un optimum de croissance à 1 g.l⁻¹ de caféine, mais est totalement inhibée à des concentrations supérieures à 5,5 g.l⁻¹. Par contre GLÜCK et LINGENS (1987) ont caractérisé une autre souche de *Pseudomonas putida* capable de croître dans un milieu contenant 20 g.l⁻¹ de caféine comme unique source d'azote et de carbone. Cependant, sa croissance est alors très ralentie et limitée.

Enfin, bien que les effets toxiques et mutagènes de la caféine soient très reconnus pour une grande majorité des microorganismes (KOCH, 1956 ; PUTRAMENT et coll., 1972 ; BUCHANAN et FLETCHER, 1978), on signalera que certaines souches restent peu sensibles à l'action de cette purine, sans pour autant être capables de la métaboliser. C'est le cas d'une souche de *Listeria monocytogenes* étudiée par PEARSON et MARTH (1990), ou celui d'une souche mutante d'*Aspergillus parasiticus* pour laquelle la présence de l'alcaloïde stimule la production d'aflatoxines (BUCHANAN et coll., 1987). Enfin, BENKÖ et SIPICZKI (1993) ont rendu une souche de *Schizosaccharomyces pombe* progressivement tolérante à la caféine, par repiquages successifs sur des milieux contenant jusqu'à 4 g.l⁻¹ de caféine. Néanmoins, la levure perd cette caractéristique lorsqu'elle n'est plus maintenue sur un milieu contenant de la caféine.

6.2.4. Influence des oligoéléments

Les éléments essentiels au développement des microorganismes fongiques sont le carbone, l'azote, l'oxygène, l'hydrogène, le phosphore, le soufre, le potassium et le magnésium (AINSWORTH et SUSSMAN, 1965).

Les champignons filamenteux présentent également des besoins importants en oligoéléments pour assurer leur développement, contrairement aux vitamines qu'ils sont généralement capables de synthétiser en plus ou moins grandes quantités (AINSWORTH et SUSSMAN, 1965 ; SMITH et BERRY, 1975 ; LASKIN et LECHEVALIER, 1978 ; ONIONS et coll., 1981). Aussi, les auteurs ayant étudié le métabolisme de la caféine chez ces microorganismes, ont toujours ajouté une source d'oligoéléments à leurs milieux de culture synthétiques (KURTZMAN et SCHWIMMER, 1971).

Lors de travaux préliminaires (DENIS, 1992), nous avons choisi d'utiliser une solution d'oligoéléments dérivée de celle proposée par SMITH et BERRY (1975). Dans la présente étude, nous avons voulu connaître l'effet de chacun des cations contenus dans cette solution, sur la physiologie des deux souches cultivées dans le milieu de base Caféine-Saccharose. Pour cela, le plan d'expérience présenté dans le paragraphe 3.9. a été utilisé.

6.2.4.1. Choix des facteurs

Les sept éléments minéraux qui entrent dans la composition de la solution d'oligoéléments utilisée dans le milieu de culture de base (paragraphe 3.2.3.1.), ont été sélectionnés comme facteurs du plan d'expérience. Les deux niveaux de chaque facteurs ont été du type absence (niveau -1) ou présence (niveau +1), avec des concentrations finales identiques à celles rencontrées dans le milieu de base (Tableau 6.3). Pour chaque oligoélément, une solution concentrée a été préparée dans de l'eau milliQ stérile, puis incorporée au milieu de base après stérilisation de celui-ci, selon la répartition définie par le plan d'expérience (paragraphe 3.9.). Les milieux de culture ont également été préparés avec de l'eau milliQ, afin de limiter l'apport non contrôlé en oligoéléments.

Tableau 6.3 : Attribution des oligoéléments à chaque facteur du plan d'expérience et définition des niveaux d'expérience.

Facteurs	Oligoéléments	Niveau -1 (Conc. finale mg.l ⁻¹)	Niveau +1 (Conc. finale mg.l ⁻¹)
1	CaCl ₂ . 2H ₂ O	0	2
2	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0	22
3	MnSO ₄ . H ₂ O	0	18
4	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0	0,404
5	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0	3,68
6	FeSO ₄ . 7H ₂ O	0	21,36
7	CuSO ₄ anhydre	0	1

Les cinétiques de croissance et de dégradation de la caféine obtenues pour chacune des deux souches sont regroupées dans la figure 6.6. Le tableau 6.4 reprend les grandeurs calculées à partir de ces courbes, qui ont servi de réponses à l'analyse statistique du plan d'expérience. Enfin, les diagrammes de la figure 6.7 illustrent, pour chacune des souches, l'effet relatif de chaque oligoélément sur les réponses analysées.

6.2.4.2. Résultats expérimentaux

La présence d'oligoéléments se révèle très importante tant au niveau de l'utilisation de la caféine qu'au niveau de la production de biomasse. Sans addition de ces derniers, la croissance des champignons est fortement ralentie, et la dégradation de la caféine est plus lente et incomplète après quatre jours de culture (Figure 6.6).

Deux autres essais ont présenté les mêmes profils de croissance et de dégradation de la caféine pour les deux souches. Il s'agit des essais dans lesquels les éléments Mn, Co, Mo, Cu d'une part et Ca, Co, Mo, Fe d'autre part, avaient été ajoutés. Il semble donc que l'addition de certains oligoéléments ne soit pas suffisante à une bonne dégradation de la caféine et à une bonne croissance des champignons. De ce fait, l'absence et/ou la présence de certains oligoéléments seraient à l'origine du mauvais développement des microorganismes.

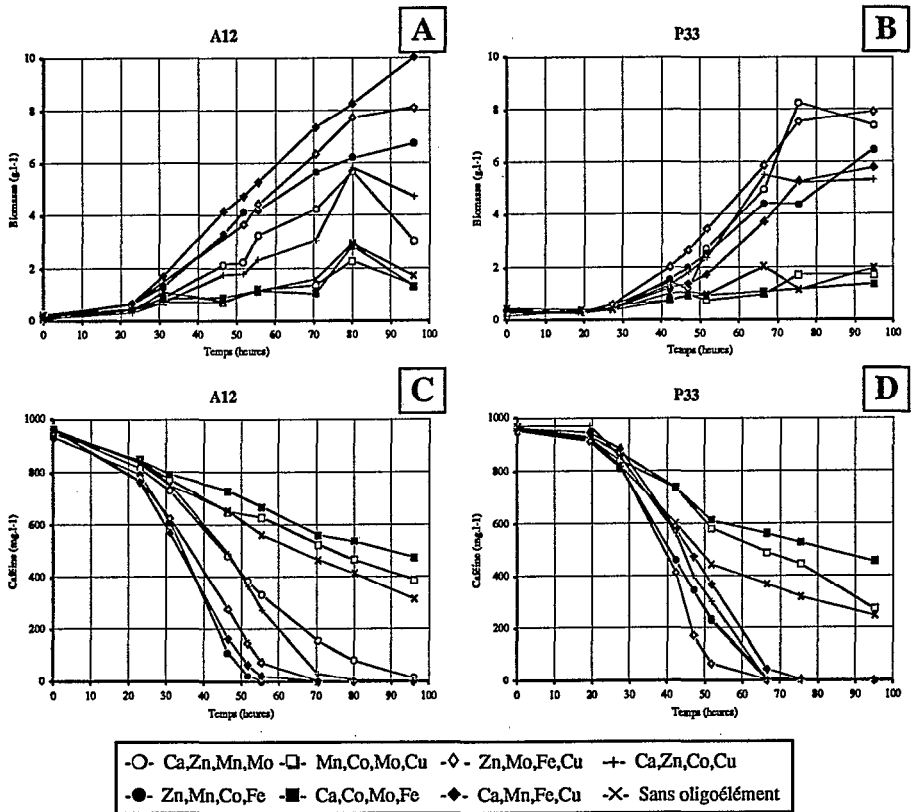


Figure 6.6: Cultures d'*Aspergillus V12A25* (A et C) et de *Penicillium V33A25* (B et D) en milieux CS contenant divers oligoéléments. Evolutions de la biomasse (A et B) et de la dégradation de la caféine (C et D).

Tableau 6.4 : Valeurs des réponses obtenues pour chaque essai du plan d'expérience sur l'effet des oligoéléments.

Souches	A12				P33			
	V max caféine (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	V moy caféine (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Biom. max (g.l ⁻¹)	V max biomasse (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	V max caféine (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	V moy caféine (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Biom. max (g.l ⁻¹)	V max biomasse (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)
Ca,Zn,Mn,Mo	16,6	9,9	5,7	0,10	23,9	14,6	7,4	0,15
Zn,Mn,Co,Fe	32,3	17,3	6,7	0,11	24,2	14,9	6,5	0,12
Mn,Co,Mo,Cu	6,5	8,5	2,3	0,02	8,0	7,1	1,7	0,02
Ca,Co,Mo,Fe	5,9	9,3	2,9	0,02	11,1	4,4	1,4	0,02
Zn,Mo,Fe,Cu	22,9	15,8	8,1	0,14	31,8	16,5	8,0	0,17
Ca,Mn,Fe,Cu	30,1	16,6	10,0	0,14	21,6	13,8	5,8	0,15
Ca,Zn,Co,Cu	19,5	12,8	5,8	0,08	23,0	14,7	5,3	0,12
Sans oligo.	7,8	9,8	2,9	0,03	14,3	6,5	2,0	0,04

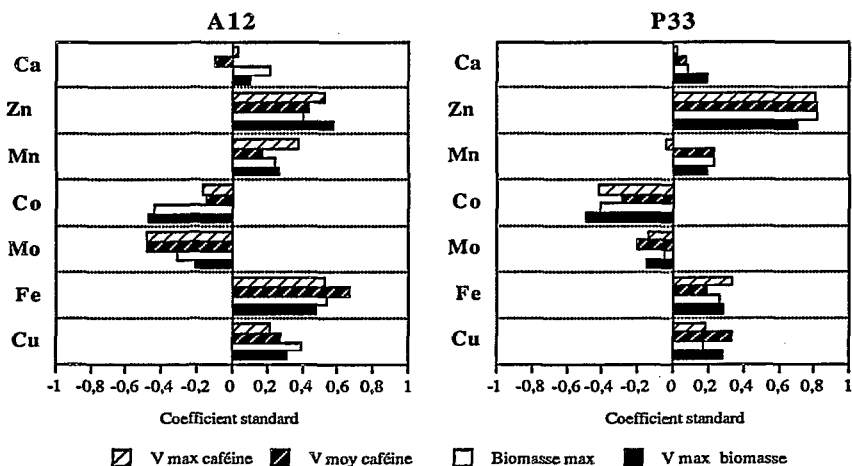


Figure 6.7 : Analyse statistique des réponses du plan d'expérience sur l'effet des oligoéléments. Diagrammes des effets relatifs de chaque oligoélément sur les paramètres étudiés.

Il serait en fait plus juste de parler de carence en oligoéléments plutôt que d'absence, car la plupart de ces éléments se retrouvent à l'état de traces dans les produits chimiques utilisés pour la préparation des milieux de culture. Par ailleurs, une faible quantité de ces oligoéléments sont amenés par l'inoculum, et peuvent être également présents dans les conidies elles-mêmes. Ceci explique vraisemblablement le fait qu'une croissance des champignons soit possible même sans addition "exogène" d'oligoéléments.

Par abus de langage, nous garderons toutefois les termes "absence" et "présence" tout au long de cette discussion.

L'analyse statistique réalisée pour la souche *Aspergillus* V12A25, montre que globalement, chaque élément trace présente le même type d'effet quelque soit la réponse analysée (Figure 6.7-A12). Le Fer, le Zinc, et dans une moindre mesure le Manganèse et le Cuivre, ont un effet positif sur le développement de cette souche cultivée sur caféine. Inversement, le Cobalt et le Molybdène présentent un effet négatif, mais ils ne semblent pas affecter les mêmes paramètres de croissance : alors que le Cobalt a une influence plutôt négative sur la production de biomasse, le Molybdène se révèle défavorable à la bonne utilisation de la caféine.

L'analyse statistique réalisée pour la souche *Penicillium* V33A25, permet de dégager des conclusions similaires à celles obtenues pour *Aspergillus* V12A25 (Figure 6.7-P33). Le Zinc est ici l'élément déterminant pour la bonne croissance du champignon ; le Fer, le Cuivre, le Manganèse puis le Calcium semblant moins indispensables. Enfin, le Molybdène et surtout le Cobalt ont des influences négatives.

Afin de vérifier l'effet négatif du Molybdène et du Cobalt présents dans la solution standard d'oligoéléments, des expériences complémentaires ont été effectuées. Elles ont eu pour but de comparer les paramètres de croissance et de dégradation de la caféine pour chaque souche cultivée en milieu Caféine-Saccharose contenant : soit la solution d'oligoéléments de base, soit des solutions renfermant les 4 ou 5 éléments ayant montré un effet positif sur le développement des deux souches. Les compositions en oligoéléments des milieux utilisés ont donc été :

Pour *Aspergillus* V12A25 :

- les 7 oligoéléments
- Zn, Fe, Cu, Mn
- Zn, Fe, Cu, Mn, Ca

Pour *Penicillium* V33A25 :

- les 7 oligoéléments
- Zn, Fe, Cu, Ca
- Zn, Fe, Cu, Mn, Ca

Les résultats issus des cinétiques de croissance et de dégradation de la caféine pour chacune des souches sont présentés dans le tableau 6.5.

Tableau 6.5 : Effet des oligoéléments sur la physiologie d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 cultivés en milieux CS contenant divers oligoéléments.
Résultats des essais complémentaires.

Souche	Oligoéléments	V max caféine (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	V moy caféine (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Biomasse maximale (g.l ⁻¹)	V max biomasse (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)
A12	les 7	30,0	18,0	7,0	0,10
	Zn, Fe, Cu, Mn	29,6	16,3	7,2	0,18
	Zn, Fe, Cu, Mn, Ca	28,6	17,2	7,2	0,16
P33	les 7	32,4	18,2	8,2	0,18
	Zn, Fe, Cu, Ca	31,9	16,8	10,7	0,21
	Zn, Fe, Cu, Mn, Ca	31,2	17,7	8,6	0,18

On constate que l'addition ou non du Molybdène, du Cobalt et du Calcium dans les cultures d'*Aspergillus* V12A25, ou du Molybdène, du Cobalt et du Manganèse dans celles de *Penicillium* V33A25, ne modifie pas de façon significative les vitesses de dégradation de la caféine de ces souches. L'effet de l'absence de ces éléments dans le milieu de culture porte plutôt sur les productions de biomasse des champignons, qui apparaissent plus rapides, surtout dans le cas d'*Aspergillus* V12A25.

6.2.4.3. Discussion

Six oligoéléments sont généralement présentés dans la littérature comme essentiels au développement des champignons filamenteux, à cause de leur implication dans la constitution et/ou la régulation de nombreuses enzymes. Il s'agit du Zinc, du Fer, du Cuivre, du Manganèse, du Calcium et du Molybdène (AINSWORTH et SUSSMAN, 1965 ; SMITH et BERRY, 1975 ; LASKIN et LECHEVALIER, 1978 ; ONIONS et coll., 1981). Cette observation conforte les résultats obtenus au cours de cette étude, où à l'exception du Molybdène, les mêmes oligoéléments montrent une influence positive sur le développement d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 cultivés dans un milieu synthétique à base de caféine.

Les influences négatives enregistrées pour le Molybdène et le Cobalt (Figure 6.5) pourraient alors résulter : soit d'une action toxique sur la cellule en raison d'une concentration trop élevée dans le milieu de culture, soit d'un effet inhibiteur de leur part sur le système enzymatique impliqué dans le catabolisme de la caféine. Cependant, les résultats de la deuxième série d'essais ne démontrent pas que le Molybdène et le Cobalt engendrent une quelconque inhibition de la dégradation de la caféine (Tableau 6.5).

Les mauvais comportements des deux souches dans trois cultures du plan d'expérience (Figure 6.4), s'expliquerait alors par une carence en oligoéléments comme le Fer et le Zinc, combinée ou non à la présence de certains autres ions (Cobalt, Molybdène). SMITH et BERRY (1975) ont déjà souligné l'existence d'interférences que peuvent exercer entre eux certains oligoéléments ; ainsi que l'importance des conditions environnementales (pH, oxygène) sur la disponibilité de ces éléments traces. Dans cette optique, une étude plus détaillée qui permettrait notamment de dégager les effets des interactions entre oligoéléments, est à envisager.

D'autre part, cette étude ne nous permet pas d'affirmer si l'absence de certains ions affecte le métabolisme général des champignons, ou uniquement celui de la caféine. En fait, seuls ASANO et coll. (1993) en travaillant sur des cultures d'une souche de *Pseudomonas putida*, ont démontré que l'addition d'ions Zn^{2+} (1 mM) dans le milieu de culture, inhibe la voie de dégradation de la caféine en conduisant à une importante accumulation de théobromine dans le surnageant.

Toutefois, notre étude visait initialement à optimiser les vitesses de dégradation de la caféine de *Penicillium* V33A25 et d'*Aspergillus* V12A25, cultivés en milieu Caféine-Saccharose. Des essais complémentaires réalisés sur *Aspergillus* V12A25, ont par ailleurs montré que le doublement de la concentration de chacun des sept oligoéléments dans le milieu CS, ne modifiait pas les caractéristiques de croissance de la souche. La solution à sept oligoéléments initialement utilisée, est donc tout à fait satisfaisante pour permettre une dégradation rapide de la caféine par les deux champignons filamenteux. Cette solution a donc été conservée pour la suite des travaux.

6.3. OPTIMISATION DES FACTEURS ESSENTIELS A LA DEGRADATION DE LA CAFEINE

Les différentes études menées jusqu'alors, nous ont permis de définir les effets de divers facteurs environnementaux, sur la physiologie d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 cultivés dans un milieu à base de caféine comme unique source d'azote. Ces travaux visaient à améliorer les conditions de culture des champignons dans le but d'augmenter principalement leur capacité à dégrader la caféine. Néanmoins, d'autres critères comme la quantité et la qualité de la biomasse produite ont été pris en compte, dans le but notamment de s'assurer d'une production mycélienne assez rapide, suffisante et active, en vue d'étudier le mécanisme de déméthylation de la caféine (chapitre 7).

Afin de valider l'ensemble de nos résultats, une ultime série d'expériences a été réalisée à l'aide de la méthodologie de planification expérimentale. L'utilisation d'un plan d'expérience permet de tester plusieurs paramètres en combinaison, tout en limitant le nombre d'essais ; et de définir ainsi les facteurs qui influencent de manière significative, le comportement des deux microorganismes vis-à-vis de la dégradation de la caféine.

6.3.1. Choix des facteurs

Le plan factoriel fractionnaire présenté au paragraphe 3.9. a été utilisé pour cette étude. Nous avons choisi de tester uniquement cinq facteurs expérimentaux dont les niveaux d'utilisation sont présentés dans le tableau 6.6, afin de pouvoir accéder à une analyse statistique complémentaire (test t) des résultats.

Tableau 6.6 : Définition de la nature et des niveaux de chaque facteur du plan d'expérience final.

Facteurs	Niveau -1	Niveau +1
1. Caféine initiale	1 g.l ⁻¹	3 g.l ⁻¹
2. Age des conidies	4 jours	7 jours
3. Oligoéléments	Fe, Zn	Fe, Zn, Mn, Mo, Ca, Cu, Co
4. Température	25°C (A12) / 20°C (P33)	30°C (A12) / 25°C (P33)
5. Sulfate d'ammonium	0 g.l ⁻¹	0,136 g.l ⁻¹

Le premier facteur est la concentration initiale en caféine. Les optima de croissance des souches sont obtenus pour des concentrations en caféine de 2 à 5 g.l⁻¹ (paragraphe 6.2.3.). Néanmoins, les modifications morphologiques et la diminution des vitesses de croissance qu'entraînent les fortes teneurs en caféine, le risque d'une limitation en saccharose (paramètre maintenu constant), ainsi que le désir de limiter la durée d'incubation des cultures, nous ont fait choisir une plage de concentrations en caféine moins élevée. Celle-ci a été fixée à 1 et 3 g.l⁻¹.

Le deuxième facteur correspond à la durée d'incubation du milieu de préculture. Les conidies produites sur le milieu Café Moulu-Saccharose (CMS) permettent le meilleur développement des souches dans le milieu de culture (paragraphe 6.2.2.). Nous avons alors voulu savoir si l'âge des conidies avait aussi une incidence sur la physiologie de nos souches. Pour cela, des conidies produites après 4 ou 7 jours d'incubation en milieu CMS, à 25°C pour *Penicillium* V33A25 et à 30°C pour *Aspergillus*, ont été utilisées.

Le troisième facteur correspond à la nature des oligoéléments ajoutés au milieu de culture. L'addition d'oligoéléments au milieu de culture, et notamment celle du Fer et du Zinc, est capitale pour le bon développement des souches (paragraphe 6.2.4.). Nous avons voulu savoir si l'association fer/zinc pouvait à elle seule permettre une meilleure croissance des champignons, que celle des sept oligoéléments initialement sélectionnés. La nature des sels minéraux et leur concentration ont été identiques à celles définies au paragraphe 3.2.3.1.

Le quatrième facteur est la température d'incubation des milieux de culture. Au cours de l'étude de ce paramètre, la plage de températures optimales pour la croissance de la souche *Penicillium* V33A25 n'a pu être déterminée (paragraphe 6.2.1.). C'est pourquoi nous avons testé à nouveau ce paramètre dont les niveaux ont été fixés à 30 et 25°C pour *Aspergillus* V12A25, et à 25 et 20°C pour *Penicillium* V33A25.

Le cinquième et dernier facteur correspond à l'addition (ou non) de sulfate d'ammonium à 0,136 g.l⁻¹ dans le milieu de culture. Comme nous le verrons dans le paragraphe 8.3.1. consacré aux mécanismes de régulation de la caféine, l'apport d'ions ammonium influence fortement la physiologie des deux champignons.

Hormis la concentration en caféine, la nature des oligoéléments et l'apport en sulfate d'ammonium, tous les autres composants du milieu de culture ont été identiques à ceux du milieu de base Caféine-Saccharose. Les solutions mères d'oligoéléments et la solution de sulfate d'ammonium ont été préparées puis ajoutées aux milieux de culture comme décrit aux paragraphes 3.2.3.1. et 8.3.1.1. respectivement. Dans les essais sans sulfate d'ammonium, un même volume d'eau stérile a été ajouté au milieu. De même, hormis le temps d'incubation des milieux de préculture et les températures d'incubation des milieux de culture, toutes les autres conditions opératoires ont été identiques à celles décrites aux paragraphes 3.3.1. et 3.3.3.

Le tableau 6.7 présente le détail des conditions de culture des 8 essais du plan d'expérience final, pour *Aspergillus* V12A25. Pour *Penicillium* V33A25, seules les températures d'incubation changent (Tableau 6.6).

Les cinétiques de dégradation de la caféine obtenues pour chaque essai du plan d'expérience sur *Aspergillus* et *Penicillium* sont présentées dans la figure 6.8. Pour plus de lisibilité, les cinétiques sont regroupées en fonction de la quantité initiale de caféine. Le tableau 6.9 reprend les grandeurs calculées à partir de ces courbes, qui ont servi de réponses à l'analyse statistique du plan d'expérience. Enfin, les diagrammes de la figure 6.9 illustrent, pour chacune des souches, l'effet relatif de chaque oligoélément sur les réponses analysées. Les résultats du test t, permettant de déterminer la probabilité qu'une réponse soit réellement influencée par un facteur, sont présentés dans la figure 6.9 sous forme de croix. L'échelle arbitraire suivante a été adoptée : +++ : $p \geq 95\%$; ++ : $95\% \geq p > 90\%$; + : $90\% \geq p > 85\%$.

Tableau 6.7 : Matrice expérimentale du plan d'expérience final pour *Aspergillus* V12A25.

Facteurs Essais	Caféine (g.l ⁻¹)	Age des conidies (j.)	Oligoéléments	Température (°C)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.l ⁻¹)
n°1	3	7	Fe,Zn,Mn,Mo,Ca,Cu,Co	25	0,136
n°2	1	7	Fe,Zn,Mn,Mo,Ca,Cu,Co	30	0
n°3	1	4	Fe,Zn,Mn,Mo,Ca,Cu,Co	30	0,136
n°4	3	4	Fe, Zn	30	0,136
n°5	1	7	Fe, Zn	25	0,136
n°6	3	4	Fe,Zn,Mn,Mo,Ca,Cu,Co	25	0
n°7	3	7	Fe, Zn	30	0
n°8	1	4	Fe, Zn	25	0

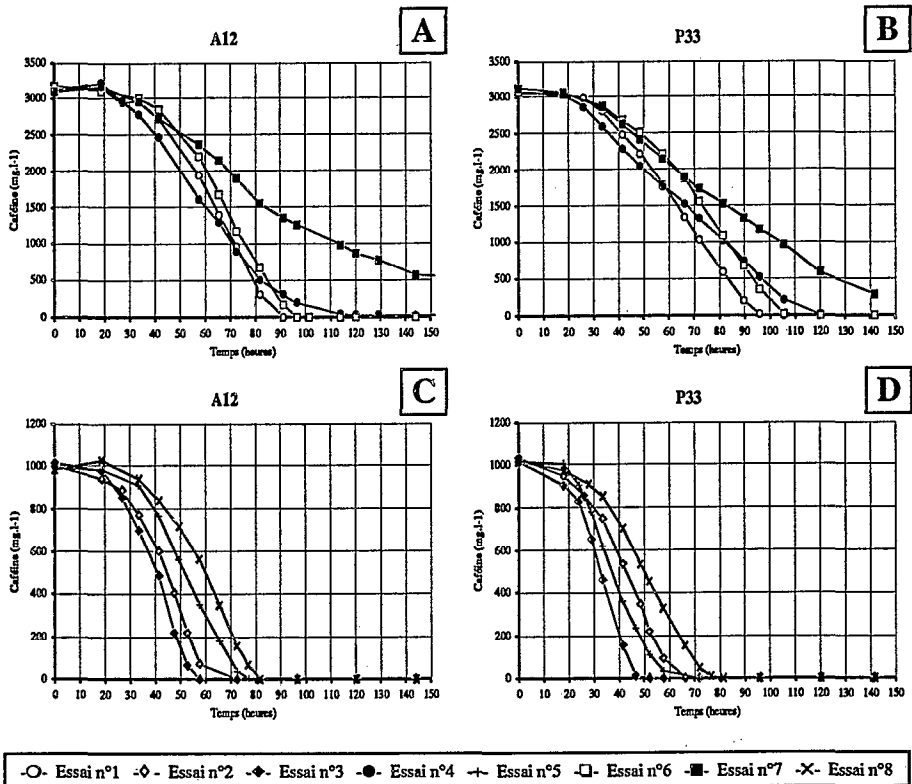


Figure 6.8 : Cinétiques de dégradation de la caféine pour chaque essai du plan d'expérience final sur *Aspergillus* V12A25 (A et C) et *Penicillium* V33A25 (B et D).

6.3.2. Résultats expérimentaux du plan d'expérience final

6.3.2.1. Remarques générales

En comparant les cinétiques de dégradation de la caféine (Figure 6.8), on constate que les deux souches présentent des comportements similaires. Ainsi, pour des concentrations initiales en caféine de 1 et 3 g.l⁻¹, les conditions permettant les meilleures dégradations de la purine sont respectivement réunies dans les essais n°3 et n°1.

Après 6 jours d'incubation, la caféine n'est pas entièrement dégradée dans l'essai n°7 chez *Penicillium*, et dans les essais n°4 et 7 chez *Aspergillus* (Figure 6.8-B et A respectivement). Dans ces deux derniers essais, malgré une prolongation de l'incubation de 2 jours, la teneur résiduelle en caféine reste inchangée dans l'essai n°4, et diminue très légèrement dans l'essai n°7 (passant de 560 à 465 mg.l⁻¹).

L'arrêt de la dégradation de la caféine semble lié à l'épuisement de la source de carbone survenant en fin de culture. En effet, le saccharose est entièrement consommé après 5 et 6 jours de culture dans les essais n°4 et 7 respectivement (Tableau 6.8). Par ailleurs, il a été démontré que les conidies des deux souches ne peuvent germer dans un milieu CS exempt de saccharose (DENIS, 1992). De ce fait, la caféine ne semble pas pouvoir être utilisée comme unique source de carbone et d'azote par *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25.

Dans la littérature, aucune souche de champignon filamenteux n'est signalée comme étant capable d'utiliser la caféine comme unique source d'azote et de carbone. Inversement, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont généralement cultivées sur caféine seule (WOOLFOLK, 1975 ; BLECHER et LINGENS, 1977). Mais aucune étude n'a montré si ce microorganisme dégradait la purine plus rapidement en présence d'une autre source de carbone.

Tableau 6.8 : Teneurs en sucres totaux résiduels (g.l⁻¹) dans chaque essai du plan d'expérience final, après 3 à 6 jours d'incubation (Saccharose Initial : 29,4 g.l⁻¹).

Souches	Temps (j.)	Essais du plan d'expérience							
		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Aspergillus</i> V12A25	3	17,5	15,2	12,1	17,1	19,8	20,0	24,2	23,2
	4	0,1	10,6	8,0	6,0	10,6	1,2	14,8	12,4
	5	0,1	5,3	3,7	0,1	6,3	0,1	7,4	9,6
	6	0,1	0,9	0,2	0,1	2,6	0,1	0,1	5,8
<i>Penicillium</i> V33A25	3	18,0	15,7	7,8	16,9	13,4	24,3	23,1	25,6
	4	0,3	6,0	1,2	3,7	5,6	7,8	12,6	10,9
	5	0,2	1,0	0,2	0,3	3,7	0,3	0,9	3,0
	6	0,3	0,3	0,2	0,3	1,2	0,3	0,3	0,3

6.3.2.2. Effets des facteurs expérimentaux sur la dégradation de la caféine

Les principaux effets des facteurs expérimentaux sur la dégradation de la caféine ont été déterminés à partir des résultats de l'analyse statistique (Figure 6.9).

- Effet de la teneur initiale en caféine

Les vitesses de dégradation de la caféine sont améliorées de manière significative chez les deux souches lorsque la concentration initiale en caféine est augmentée (de 1 à 3 g.l⁻¹).

- Effet de l'âge des conidies

Ce facteur ne présente aucune réelle influence sur la physiologie des champignons filamenteux. Des conidies de 4 à 7 jours peuvent donc être indifféremment utilisées pour ensemençer les milieux de culture.

- Effet des oligoéléments

Ce facteur présente un effet important sur les vitesses de dégradation de la caféine. Il ressort de l'analyse statistique que la seule présence d'ions fer et zinc n'est pas suffisante à une dégradation rapide et correcte de la caféine.

- Effet de la température d'incubation

Ce paramètre de culture est surtout influant chez *Penicillium* V33A25. La dégradation de la caféine est en effet accélérée de manière relativement significative lorsqu'une température d'incubation de 20°C est préférée à une température de 25°C. Chez *Aspergillus* V12A25, une température d'incubation comprise entre 25 et 30°C ne modifie pas de manière significative les caractéristiques de dégradation de la caféine.

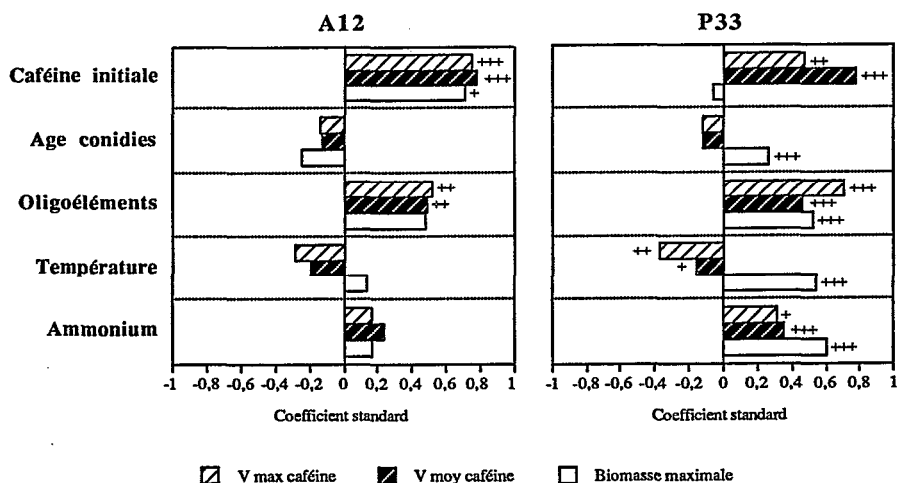
- Effet de l'addition de sulfate d'ammonium

L'addition d'une faible quantité de sulfate d'ammonium au milieu de culture ne modifie pas les caractéristiques d'*Aspergillus* V12A25. Par contre, elle améliore les vitesses de dégradation de la caféine chez *Penicillium*.

Tableau 6.9 : Valeurs des réponses obtenues pour chaque essai du plan d'expérience final.

Souches	A12			P33		
	V max caféine (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	V moy caféine (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Biom. max (g.l ⁻¹)	V max caféine (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	V moy caféine (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Biom. max (g.l ⁻¹)
1	66,6	35,9	10,6	49,9	32,8	9,6
2	33,4	17,0	8,9	29,0	16,9	9,5
3	34,0	18,4	8,9	38,9	21,6	10,5
4	49,9	28,3 *	12,0	32,9	27,2	8,9
5	26,0	13,0	6,6	31,6	17,0	8,4
6	63,9	33,0	12,7	50,5	30,0	7,4
7	31,4	17,2 *	8,0	26,0	19,5 *	8,2
8	26,9	12,3	5,3	23,5	13,8	6,3

* valeur estimée



Commentaire de la légende :

Importance statistique du facteur sur la réponse : +++ Forte, ++ Moyenne, + Faible, "Sans +" Aucune

Figure 6.9 : Analyse statistique des réponses du plan d'expérience final. Diagrammes des effets relatifs et degrés d'influence de chaque facteur sur les paramètres étudiés.

6.3.2.3. Effets des facteurs expérimentaux sur la production de biomasse

La production de biomasse d'*Aspergillus* V12A25 peut être légèrement améliorée si la quantité de caféine est augmentée dans le milieu de culture par rapport à son niveau de base (Figure 6.9-A12). Par contre, considérés dans leurs limites respectives, les autres facteurs n'influencent pas la production de biomasse de ce champignon.

A l'inverse, celle de *Penicillium* V33A25 est indépendante de la quantité de caféine et semble influencée par tous les autres facteurs (Figure 6.9-P33). Ces derniers devraient être fixés à leur niveau supérieur pour optimiser la quantité de biomasse de *Penicillium*.

La différence de résultat observée entre les deux souches est assez remarquable et surprenante, surtout lorsque l'on compare les valeurs relativement homogènes de biomasses maximales obtenues à l'issue des 8 essais du plan d'expérience sur *Penicillium* V33A25 (Tableau 6.9).

Au cours de l'étude préliminaire, il a été démontré que la quantité de biomasse des deux champignons filamenteux augmente avec la concentration de saccharose dans le milieu de culture, sans modifier les vitesses de dégradation de la caféine (DENIS, 1992). La production de biomasse est de ce fait fortement influencée par la quantité de saccharose présente dans le milieu de culture. Il est alors possible que l'analyse statistique réalisée sur les résultats de ce plan d'expérience ait fait ressortir des influences réelles mais mineures de certains des facteurs environnementaux étudiés, par rapport à l'effet qu'aurait provoqué une variation de la teneur en saccharose sur la capacité des champignons à produire d'importantes quantités de biomasse. Ces résultats restent néanmoins à confirmer.

6.3.2.4. Effets des facteurs expérimentaux sur le développement mycélien

Dans les cultures n°1, 6, et 8 d'*Aspergillus* V12A25, présentant une température d'incubation de 25°C, il n'y a pas de conidiogenèse même après 6 jours d'incubation. Il semble donc possible de limiter ou de retarder la conidiogenèse chez *Aspergillus*, en cultivant cette souche à 25°C plutôt qu'à 30°C.

Le mycélium d'*Aspergillus* V12A25 de l'essai n°4 a développé une morphologie "atypique" et identique à celle observée préalablement dans la culture à 5 g.l⁻¹ de caféine initiale (paragraphe 6.2.3.). Par contre, dans les autres essais contenant 3 g.l⁻¹ de caféine, le mycélium s'est développé normalement (comme dans les essais à 1 g.l⁻¹ de caféine). L'absence d'un développement "atypique" dans les cultures de *Penicillium* V33A25 contenant 3 g.l⁻¹ de caféine initiale, tend également à prouver que les deux champignons ne sont pas spécialement affectés par une telle concentration en caféine.

Dans les cultures de *Penicillium* contenant du sulfate d'ammonium, le mycélium s'est développé préférentiellement sous forme de réseau, plutôt que sous forme de pelotes. Ce mode de développement serait à l'origine de l'amélioration de la dégradation de la caféine par cette souche, puisqu'il permet d'augmenter la surface d'échange entre le champignon et le milieu extracellulaire. Ce phénomène sera également développé au paragraphe 8.3.1.5.

6.3.3. Conditions optimales de culture d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25

La réalisation d'un plan d'expérience a permis de déterminer ou de confirmer l'effet de certains facteurs environnementaux sur la physiologie d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25, lorsque ces deux champignons filamenteux sont cultivés dans un milieu synthétique à base de caféine et de saccharose.

La combinaison de ces résultats et de ceux des études précédentes nous ont permis de dresser un bilan sur les niveaux d'utilisation des principaux paramètres de culture. Ces conditions, présentées dans le tableau 6.10, devraient assurer une dégradation de la caféine, et une croissance mycélienne optimales, c'est-à-dire :

- des vitesses élevées de dégradation de la caféine,
- une production de biomasse importante, rapide et ne présentant pas de fructification, ni de structure somatique atypique.

Tableau 6.10 : Conditions optimales de croissance d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25, cultivés en milieu synthétique liquide à base de caféine.

Conditions optimales	<i>Aspergillus</i> V12A25	<i>Penicillium</i> V33A25
1. Préculture	Production de conidies sur milieu gélosé Café Moulu - Saccharose (CMS) durant 4 à 7 jours d'incubation	
2. Température d'incubation ²	Optimum de croissance : 25 à 30°C. La limite inférieure permet de réduire la formation de fructifications en culture liquide	Optimum de croissance : 20 à 25°C. La limite inférieure permettrait d'améliorer les vitesses de dégradation de la caféine
3. Teneur initiale en caféine	Optimum : 3 à 4 g.l ⁻¹ de caféine initiale. Assez fort effet toxique à 5 g.l ⁻¹ (niveau morphologique). Même quantité maximale de biomasse pour 1 à 5 g.l ⁻¹ de caféine (et 30 g.l ⁻¹ de saccharose). Croissance la plus rapide pour 2 g.l ⁻¹ . Meilleures vitesses maximales de dégradation de la caféine pour 3 et 5 g.l ⁻¹ . Dégradation incomplète de la caféine à 5 g.l ⁻¹ .	Optimum : 4 à 5 g.l ⁻¹ de caféine initiale. Assez faible effet toxique à 5 g.l ⁻¹ (niveau morphologique). Même quantité maximale de biomasse pour 1 à 10 g.l ⁻¹ de caféine (et 30 g.l ⁻¹ de saccharose). Croissance la plus rapide pour 2 g.l ⁻¹ . Meilleures vitesses maximales de dégradation de la caféine pour 3 et 5 g.l ⁻¹ . Dégradation complète de la caféine à 5 g.l ⁻¹ .
4. Présence de sulfate d'ammonium	Inutile à 0,136 g.l ⁻¹ .	Bénéfique à 0,136 g.l ⁻¹ . Améliore la vitesse maximale de dégradation de la caféine.
5. Source de carbone et d'énergie	Le saccharose est préférable au glucose. Une concentration initiale de 30 g.l ⁻¹ environ semble suffisante pour permettre une dégradation complète et sans ralentissement de la caféine, initialement présente à 3 voire 4 g.l ⁻¹ (soit un rapport C/N de 17 à 13).	
6. Oligoéléments	Oligoéléments indispensables : fer, zinc, cuivre, manganèse, voire calcium. L'ajout de cobalt et de molybdène est inutile.	
7. pH initial	Un pH acide (≈ 4) est préférable afin d'éviter la production de pigments dans le milieu de culture (DENIS, 1992).	
8. Taux d'inoculation	Un taux de 10 ⁶ conidies.ml ⁻¹ limite la phase de latence (DENIS, 1992).	

6.4. CONCLUSION

L'étude de l'influence de divers facteurs environnementaux sur le développement d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 cultivés en milieu submergé à base de caféine, nous a permis de mieux appréhender la physiologie de ces deux souches sauvages de champignons filamenteux.

Il ressort de ces travaux que les conditions optimales de croissance permettant d'obtenir les meilleures vitesses de dégradation de la caféine, sont très proches pour les deux souches (Tableau 6.10), traduisant ainsi une certaine similitude de leur comportement, lorsque l'alcaloïde est utilisé à des concentrations non, voire faiblement toxiques (inférieures à 5 g.l⁻¹).

Ainsi, les deux souches sont capables de dégrader entièrement la caféine et de l'utiliser comme unique source d'azote. Par contre, la caféine se semble pas pouvoir servir comme unique source d'azote et de carbone. En conditions optimales, les vitesses maximales de dégradation de la caféine des deux souches peuvent atteindre 85 mg.l⁻¹.h⁻¹, pour une production maximale de biomasse de 10 g.l⁻¹ en moyenne.

Cependant, outre la différence de température optimale existant entre *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25, la caractéristique physiologique qui distingue les deux champignons est le seuil de résistance à la caféine. Ce dernier est supérieur chez *Penicillium* V33A25 : il est compris entre 20 et 50 g.l⁻¹, contre seulement 10 à 20 g.l⁻¹ chez *Aspergillus* (ce qui est déjà assez élevé). D'autre part la résistance de *Penicillium* aux concentrations élevées en caféine se traduit par des modifications morphologiques moins marquées chez cette souche que chez *Aspergillus* V12A25.

En fait, d'une manière générale, la morphologie d'*Aspergillus* V12A25 est beaucoup plus affectée par les variations environnementales que celle de *Penicillium* V33A25, lorsque les deux microorganismes sont cultivés sur de la caféine comme unique source d'azote. On notera en particulier chez *Penicillium*, l'absence de production de formes de reproduction asexuée (excepté dans le cas où la teneur initiale en caféine est très faible). Par contre, cultivé dans des conditions favorables et non limitantes, *Aspergillus* se développe sous forme de pelotes mycéliennes beaucoup moins denses que celles de *Penicillium*, facilitant de ce fait les échanges avec le milieu environnant.

L'addition d'ions ammonium dans le milieu de base Caféine-Saccharose va néanmoins s'avérer très bénéfique au développement de *Penicillium* V33A25 en permettant une croissance plus homogène du champignon (réseau mycélien) et de ce fait, une amélioration des vitesses de dégradation de la caféine. Ce phénomène sera plus développé au chapitre 8.

CARACTERISATION DE
L'ACTIVITE CAFEINE DEMETHYLASE
CHEZ *Aspergillus* V12A25

7. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE CAFEINE DEMETHYLASE CHEZ *Aspergillus* V12A25

7.1. INTRODUCTION

L'activité caféine déméthylase a essentiellement été caractérisée chez l'homme et les animaux de laboratoire où elle implique plusieurs isoformes de cytochrome P-450, localisées dans la membrane du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques (ARNAUD, 1993). Ces enzymes fonctionnent en association avec une NADPH-cytochrome P-450 réductase et en présence d'O₂. Par ailleurs, certaines activités méthylxanthines déméthylases ont plus rarement fait l'objet d'études sur des extraits cellulaires bruts de bactéries appartenant à l'espèce *Pseudomonas putida* (HOHNLOSER et coll., 1980 ; GLÜCK et LINGENS, 1988 ; ASANO et coll., 1994). Ces activités sont également NAD(P)H dépendantes. Mais seuls ASANO et coll. (1994) ont réussi à purifier une enzyme cytoplasmique responsable de la N³-déméthylation de la théobromine en 7-méthylxanthine chez une souche de *Ps. putida*.

Chez les champignons filamenteux capables de dégrader la caféine et de l'utiliser comme source d'azote, l'activité caféine déméthylase n'a jamais été caractérisée *in vitro*. D'autres activités déméthylasiques ont cependant fait l'objet d'études approfondies, principalement chez des champignons phytopathogènes. Il s'agit principalement d'une activité stérol 14 α -déméthylase intervenant dans la biosynthèse de l'ergostérol (GUAN et coll., 1992 ; KAPTEYN et coll., 1992 ; STEHMANN et coll., 1994), et de l'activité pisatine déméthylase permettant au champignon *Nectria haematococca* de lutter contre cette phyto-alexine produite par le pois, *Pisum sativum* (MATTHEWS et VAN ETTEN, 1983 ; MALONEY et VAN ETTEN, 1994). Ces deux activités déméthylasiques sont retrouvées dans les fractions microsomales issues des microorganismes. Elles sont dues à des systèmes enzymatiques impliquant des cytochromes P-450, et sont NADPH et O₂ dépendantes.

Dans l'étude qui suit, nous avons cherché à définir les principales caractéristiques de l'activité caféine déméthylase responsable de la première étape de dégradation de la caféine chez les deux champignons filamenteux sélectionnés. La souche *Aspergillus* V12A25 a rapidement été retenue comme support à cette étude car des travaux préliminaires, réalisés en conditions non optimales, ont montré que l'activité enzymatique issue de cette souche était quantitativement plus importante que celle issue de *Penicillium* V33A25.

7.2. LOCALISATION DE L'ACTIVITE CAFEINE DEMETHYLASE

Chez l'homme et les animaux, l'activité caféine déméthylase est membranaire et localisée dans les microsomes hépatiques (ARNAUD, 1993). Par contre, chez les bactéries du genre *Pseudomonas*, cette activité est cytoplasmique (HOIINLOSER et coll., 1980). Chez les champignons filamenteux aptes à dégrader la caféine, l'activité enzymatique n'a pas été localisée. Cependant, il a été démontré pour ces microorganismes que les enzymes impliquées dans la dégradation de la xanthine en ammonium sont intracellulaires (SCAZZOCCHIO et DARLINGTON, 1968 ; ALLAM et ELZAINY, 1969).

Les champignons filamenteux sont néanmoins connus pour excréter de nombreuses enzymes dans le milieu environnant, surtout dans le but d'hydrolyser des substrats complexes comme la cellulose ou l'amidon (ROUSSOS, 1985). Nous avons donc cherché dans un premier temps à mettre en évidence l'activité dans le surnageant de culture, puis dans un deuxième temps dans le mycélium d'*Aspergillus* V12A25.

7.2.1. Recherche dans le surnageant de culture

Une première expérience a été menée à partir d'une culture d'*Aspergillus* V12A25 en milieu de base Caféine-Saccharose de 48 heures à 30°C. Un échantillon de 3 ml a été prélevé puis filtré (0,45 µm). Une partie du filtrat a été rapidement congelée à -20°C afin de servir de témoin. L'autre partie a été incubée à 30°C pendant 4 h. 30, en même temps que le reste de la culture.

Les analyses de la caféine par CLHP révèlent que comparativement au témoin, la concentration en caféine du surnageant de culture filtré (exempt de mycélium) reste constante après 4 h. 30 d'incubation à 30°C, alors que dans le même temps, cette concentration passe de 450 à 300 mg.l⁻¹ dans le milieu de culture.

Une deuxième expérience a montré que le surnageant d'une même culture d'*Aspergillus* V12A25, filtré puis concentré 20 fois sur cellule AMICON (paragraphe 3.8.1.2.), ne présente aucune activité caféine déméthylase (réalisée en conditions standards). Par ailleurs, la quantité de protéines du surnageant concentré est très faible (< 10 µg.ml⁻¹).

L'activité caféine déméthylase n'est donc pas extracellulaire chez *Aspergillus* V12A25, lorsque cette souche est cultivée en milieu submergé, à base de caféine.

7.2.2. Recherche dans le mycélium

La localisation de l'activité caféine déméthylase dans la biomasse fongique a nécessité une étape préalable de mise au point d'une méthode de broyage du mycélium.

7.2.2.1. Sélection d'une méthode de broyage du mycélium

Plusieurs méthodes de broyage ont été évaluées pour leur capacité à fragmenter le mycélium d'*Aspergillus* V12A25 (48 h. ; 30°C ; milieu CS), sans provoquer d'élévation de la température du contenu intracellulaire récupéré dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7,2). Il s'agissait des méthodes :

- par sonication ;
- par des billes de verre, et agitation au vortex ;
- par écrasement au mortier en présence de sable de Fontainebleau ;
- par écrasement au mortier en présence d'azote liquide.

Des observations au microscope optique des quatre broyats obtenus ont montré que les deux dernières méthodes sont les plus efficaces à casser les structures membranaires du champignon. De plus, les broyages du mycélium au mortier n'entraînent pas de surchauffe ni de dilution excessive du contenu cellulaire au cours du traitement, contrairement aux deux autres méthodes testées. Dans le cas d'un broyage en présence de sable de Fontainebleau, l'utilisation d'un mortier préalablement congelé à -20°C, permet de maintenir le mycélium à basse température pendant toute l'opération, comme dans le cas du broyage en présence d'azote liquide. Les méthodes de broyage par sonication et à l'aide de billes de verre n'ont donc pas été retenues par la suite.

L'efficacité du fractionnement du mycélium d'*Aspergillus* par les deux méthodes au mortier est similaire. Elle n'est cependant pas optimale car des morceaux de mycélium intacts sont toujours observables au microscope. Nous avons vérifié par la suite que l'activité déméthylasique des deux extraits intracellulaires ainsi produits était identique. Cependant, pour des raisons pratiques, nous avons choisi la méthode utilisant du sable de Fontainebleau (dérivée de celle proposée par ALLAM et ELZAINY, 1969). Cette méthode est présentée en détail dans le paragraphe 3.7.1.

Dans le but d'améliorer la fragmentation du mycélium, des essais de digestions enzymatiques de la paroi ont été réalisés avant broyage au mortier. Deux préparations enzymatiques ont été testées (Chitinase, SIGMA C-6137, et Novozym 234, SIGMA L-2265) dans les conditions adaptées de COTTON et coll. (1993) et BARTHOMEUF et coll. (1994) pour la production de protoplastes fongiques ou l'extraction d'enzymes intracellulaires. Ces essais complémentaires n'ont pas permis de récupérer l'activité caféine déméthylase de la biomasse ainsi pré-traitée.

7.2.2.2. Localisation de l'activité dans un broyat mycélien

La biomasse fraîche d'*Aspergillus* V12A25 issue d'une culture en milieu Caféine-Saccharose (48 h ; 30°C) a été utilisée pour déterminer par centrifugation différentielle la fraction cellulaire responsable de la déméthylation de la caféine. Après lavage puis broyage du mycélium dans les conditions décrites au paragraphe 3.7.1., le broyat a été récupéré par 6 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7,8. Deux étapes de centrifugation ont alors été menées :

- une première centrifugation à 5.000 g/15 min/4°C a été réalisée sur cet extrait. Cette opération correspond à une élimination du sable et des débris cellulaires ou des fragments mycéliens non broyés. Une partie du surnageant S1 ainsi récupéré a été conservée à +4°C avant analyse.
- une deuxième centrifugation à 200.000 g/60 min/4°C a été réalisée sur l'autre partie du surnageant S1. Cette opération correspond à une élimination de tous les organites cellulaires (noyaux, mitochondries, microsomes,...). Le surnageant S2 ainsi récupéré a été maintenu à +4°C avant analyse et le culot C2 a été repris dans 1 ml de tampon.

Remarque : il a été vérifié que les débris cellulaires isolés du premier culot de centrifugation ne présentent pas d'activité caféine déméthylase, et que le lavage de ce culot est inutile (faible activité récupérée).

Les activités déméthylasiques réalisées dans les conditions décrites au paragraphe 3.7.2., et les concentrations en protéines de chaque fraction protéique (S1, S2 et C2) sont données dans le tableau 7.1.

Tableau 7.1 : Bilan des activités caféine déméthylase (A.D.) réalisées sur les différentes fractions protéiques obtenues par centrifugation différentielle d'un broyat mycélien (écart-types sur trois répétitions).

Fractions protéiques	Volumes des fractions (ml)	Protéines (mg.ml ⁻¹)	Protéines totales (mg)	A.D. (pmol caf.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	Activités totales (pmol caf.min ⁻¹)
S1 (surnageant 1e centri.)	6,7	4,66 (0,11)	31,2 (0,7)	139 (15)	4337 (478)
C2 (culot 2e centri.)	1,1	2,98 (0,09)	3,3 (0,1)	39 (16)	129 (53)
S2 (surnageant 2e centri.)	6,6	3,10 (0,03)	20,5 (0,2)	356 (42)	7298 (864)

L'activité caféine déméthylase (A.D.) se retrouve essentiellement dans le surnageant du liquide intracellulaire d'*Aspergillus* V12A25, obtenu après ultracentrifugation (Tableau 7.1) ; le culot C2 ne présentant pas ou peu d'activité. Ainsi, cette activité enzymatique apparaît cytoplasmique, et non liée à une structure membranaire de type microsome comme dans le cas des cellules hépatiques humaines et animales.

La partie non active de protéines éliminées par ultracentrifugation représente une fraction importante (environ 34 %) des protéines totales récupérées après broyage de la biomasse (Tableau 7.1). L'élimination des organites cellulaires permet d'augmenter l'activité spécifique de l'extrait brut d'un facteur de 2,6 en moyenne, mais également d'accroître l'activité totale de cet extrait d'un facteur de 1,7 en moyenne. Cette augmentation de l'activité totale pourrait être due à une disparition de facteurs inhibiteurs de la réaction, responsables par exemple de l'oxydation du cofacteur réduit (NADPH).

L'opération d'ultracentrifugation représente donc une première étape de purification qui a toujours été maintenue par la suite ; le surnageant ainsi obtenu étant considéré comme l'extrait intracellulaire brut (EIB) sur lequel tous les travaux ont porté.

7.2.2.3. Qualité de la biomasse d'*Aspergillus* V12A25

Afin de nous assurer de la présence d'une quantité importante de décaféinases dans le mycélium, nous avons jusqu'à présent choisi de travailler sur de la biomasse fraîche d'*Aspergillus* V12A25, obtenue sur le milieu de base Caféine-Saccharose, après 48 heures de culture à 30°C. A ce stade du développement du champignon, la caféine est encore présente dans le milieu et sa vitesse de dégradation est maximale (chapitre 6). Par ailleurs, le mycélium est généralement sous forme végétative (absence de forme de reproduction asexuée) et en phase de croissance exponentielle. Cependant, les quantités de biomasse sont environ 3 fois moins importantes dans ce cas, que celles atteintes après 3 à 4 jours de culture ; et de ce fait, les quantités de protéines récupérées sont moins élevées.

Nous avons donc recherché à mesurer l'activité caféine déméthylase sur trois cultures d'*Aspergillus* en milieu Caféine-Saccharose, réalisées dans les mêmes conditions (paragraphe 3.3.3.), et conduites pendant 2, 3 et 4 jours respectivement. Les trois extraits intracellulaires bruts issus des biomasses fraîches ont été produits dans les conditions standards (paragraphe 3.7.1.).

Les résultats du dosage de l'activité caféine déméthylase sur chaque extrait intracellulaire brut, montrent que seule la biomasse récupérée après 2 jours d'incubation à 30°C présente cette activité enzymatique. Parallèlement, le dosage des méthylxanthines dans les surnageants de culture révèle que la caféine a été épuisée uniquement dans les cultures de 3 et 4 jours.

La disparition du substrat dans le milieu de culture s'accompagnerait donc d'une disparition de l'activité caféine déméthylase. Celle-ci peut être due à une inactivation du système enzymatique, ou plus vraisemblablement à une dégradation rapide des décaféinases (action de protéases), combinée à un arrêt de la synthèse de ces enzymes. Ces observations suggèrent donc l'existence d'un mécanisme d'induction de la synthèse des enzymes impliquées dans la dégradation de la caféine ; mécanisme qui sera confirmé par d'autres études présentées au paragraphe 8.3.2.1.

Par la suite, les biomasses utilisées pour la production d'extraits intracellulaires bruts ont été issues de cultures réalisées en milieu Caféine-Saccharose à 30°C, et pour lesquelles :

- la caféine était toujours présente dans le surnageant de culture,
- la vitesse de dégradation de la caféine était maximale,
- la biomasse se présentait sous forme végétative.

Toutes ces conditions correspondent généralement à des temps de culture de 45 à 48 heures.

7.2.3. Conclusion

Les études réalisées précédemment, démontrent que le système enzymatique responsable de la N-déméthylation de la caféine chez *Aspergillus* V12A25 cultivé en milieu submergé à base de caféine, est intracellulaire et cytoplasmique. Toutefois, on ne peut écarter la possibilité d'être en présence d'un système faiblement lié à une structure membranaire *in vivo*, qui serait libéré lors des opérations d'extraction du contenu cellulaire du champignon.

Cette localisation de l'activité déméthylasique est identique à celle rencontrée chez plusieurs souches de *Pseudomonas putida* (HOHNLOSER et coll., 1980 ; ASANO et coll., 1994). Inversement, dans les cellules hépatiques des êtres supérieurs (GRANT et coll., 1987 ; BERTHOU et coll., 1989 ; AGÚNDEZ et coll., 1992), mais également dans une souche de *Saccharomyces uvarum* (SAUER et coll., 1982), l'activité caféine déméthylase est associée à des microsomes, issus d'une dissociation du réticulum endoplasmique lors du broyage des cellules. Ces microsomes sont généralement récupérés dans les culots issus de centrifugations allant jusqu'à 105.000 g. Le système enzymatique responsable de la déméthylation de l'alcaloïde implique alors dans tous ces cas, diverses isoenzymes appartenant à la famille des cytochromes P-450, incluses dans la structure membranaire des microsomes.

Nous avons tenté d'isoler des microsomes chez *Aspergillus* V12A25 par deux méthodes plus spécifiques que celle utilisée jusqu'à présent (ultracentrifugation à 200.000 g en tampon phosphate). Il s'agissait des méthodes par précipitation au chlorure de calcium et par ultracentrifugation dans un tampon saccharosé (SAUER et coll., 1982 ; HARRIS et ANGAL, 1989). Dans les deux cas, l'activité caféine déméthylase n'a pas été retrouvée dans les fractions microsomales mais dans les surnageants de centrifugation ; confirmant ainsi que dans le cas d'*Aspergillus* V12A25, le système enzymatique mis en jeu est différent de celui des autres cellules eucaryotes.

Néanmoins, l'implication d'une enzyme du genre des cytochromes P-450 ne peut être totalement écartée, car ces enzymes ont également été retrouvées sous forme "libre" dans le cytoplasme de divers microorganismes (BERG et coll., 1975 ; HOROWITZ et VILKER, 1993 ; LIU et ROSAZZA, 1993 ; SERIZAWA et MATSUOKA, 1993).

7.3. MISE AU POINT DU DOSAGE DE L'ACTIVITE CAFEINE DEMETHYLASE SUR UN EXTRAIT INTRACELLULAIRE BRUT

Comme pour toute activité enzymatique, nous avons voulu définir dans un premier temps les conditions essentielles du dosage de l'activité caféine déméthylase d'un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25, comprenant : les quantités de substrat, de cofacteurs et de protéines ; le pH du tampon utilisé ; la température et le temps de la réaction.

7.3.1. Conditions initiales

Certaines conditions initiales de la réaction enzymatique ont été fixées à partir des expériences réalisées sur des microsomes hépatiques (GRANT et coll., 1987 ; BERTHOU et coll., 1989 ; AGÚNDEZ et coll., 1992), et sur des extraits intracellulaires bruts (EIB) de bactéries aptes à dégrader la caféine (HOHNLOSER et coll., 1980 ; GLÜCK et LINGENS, 1988 ; ASANO et coll., 1994). Ces conditions ont été les suivantes :

- Volume réactionnel (VR) de 1 ml
- Caféine à 1 mM dans VR
- NADPH à 1 mM et $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ à 5 mM dans VR
- Tampon phosphate (K/Na) 50 mM, pH 7,8

Les réactions enzymatiques ont toujours été initialisées par addition de l'extrait intracellulaire brut (en général, 500 μ l), puis arrêtées par addition de 50 μ l d'acide trichloracétique à 50 % (p/v). Les échantillons ont ensuite été traités comme décrit dans le paragraphe 3.6.1. La température d'incubation de la réaction enzymatique a été fixée à 30°C, car cette valeur correspond à la température optimale de croissance du microorganisme cultivé en milieu Caféine-Saccharose (paragraphe 6.2.1.). Enfin, dans un premier temps, la durée de la réaction a été fixée à 3 heures.

Des essais témoins ont préalablement permis de vérifier que :

- l'EIB ne contient aucune méthylxanthine (détectable dans les conditions expérimentales employées) ;
- en absence d'EIB, la caféine n'est pas transformée ;
- en absence de caféine, aucun composé identifiable en tant que méthylxanthine par les deux méthodes chromatographiques utilisées, n'est formé au cours de la réaction ;
- lorsque du TCA est ajouté dès le début de la réaction (précipitation des protéines de l'EIB), la caféine n'est pas transformée.

Ce dernier essai témoin a systématiquement été réalisé par la suite, car il sert à déterminer la concentration initiale de la caféine dans les volumes réactionnels. Ces échantillons témoins sont traités dans les mêmes conditions que les essais enzymatiques.

7.3.2. Quantité de substrat

La concentration en caféine dans le volume réactionnel (VR) a été choisie de manière à travailler en excès de substrat et en considérant les limites de résolution de l'analyse de la caféine par CLHP.

Pour cela, trois concentrations en caféine ont été testées (0,1 ; 0,5 et 1 mM) dans les conditions suivantes : VR 1 ml ; protéines 1,25 mg ; NADPH en concentrations identiques à celles de la caféine ; MgCl₂ en concentrations cinq fois supérieures à celles de la caféine ; réaction 30°C - 3 h. Les activités enzymatiques ont été évaluées en fonction des quantités de méthylxanthines apparues au cours de la réaction (Tableau 7.2). La sensibilité du détecteur de la CLHP ayant été augmentée afin de mieux visualiser ces produits (paragraphe 3.6.1.2.), leurs quantités n'ont pu être exprimées ici qu'en unités de surface, données par le système d'intégration.

Tableau 7.2 : Effet de la concentration en caféine sur l'activité caféine déméthylase.
Quantification des produits de la réaction exprimée en unité de surface
(moyenne sur deux répétitions).

Produits de la réaction	Caféine dans VR (mM)		
	0,1	0,5	1,0
Théophylline	34	100	108
3-méthylxanthine	11	20	13

Pour les trois concentrations initiales en caféine, deux métabolites sont principalement formés après 3 heures de réaction à 30°C : la théophylline et la 3-méthylxanthine. Dans le même temps, la caféine est toujours présente dans les différents volumes réactionnels. D'un point de vue quantitatif, les produits de la réaction sont plus importants pour des concentrations initiales en caféine de 0,5 à 1 mM, que pour une concentration initiale de 0,1 mM. Ainsi, dans les conditions expérimentales appliquées à cette étude, l'activité enzymatique apparaît plus importante et constante pour une concentration en caféine comprise entre 0,5 et 1 mM dans le volume réactionnel. Une concentration initiale de 0,5 mM a été retenue par la suite ; la limitation de la quantité de caféine dans le volume réactionnel permettant de réduire les pertes en méthylxanthines durant l'étape d'extraction de ces produits (paragraphe 3.6.1.1.).

A ce stade des travaux, nous avons choisi de mesurer l'activité déméthylasique en fonction de la consommation du substrat et non en fonction de l'apparition des produits de la réaction (méthode utilisée par AGÚNDEZ et coll., 1992), ou de la consommation du cofacteur réduit (méthode utilisée par GLÜCK et LINGENS, 1988).

Les raisons de ce choix ont été basées sur le fait que l'extrait intracellulaire brut renferme *a priori* tout ou partie du système enzymatique impliqué dans le catabolisme de la caféine. De ce fait, l'action de l'EIB sur la caféine se traduit par l'apparition de plusieurs métabolites subissant eux-mêmes une succession de réactions, éventuellement consommatrices de cofacteurs réduits (paragraphe 8.2.). Ces réactions secondaires peuvent conduire à la formation de produits non détectables par les méthodes de CLHP et de CCM, développées seulement pour l'analyse des méthylxanthines. Ainsi, il a été vérifié que la somme des quantités de méthylxanthines retrouvées dans le volume réactionnel, était inférieure à la quantité de caféine disparue. De même, il n'a pas été possible de corréler la disparition du NADPH utilisé comme cofacteur (par lecture spectrophotométrique directe) avec la consommation de caféine. Ce dernier intervient vraisemblablement dans d'autres réactions présentes dans l'extrait intracellulaire brut.

7.3.3. Durée de la réaction

Nous avons voulu déterminer l'effet de la durée de la réaction sur l'activité caféine déméthylase, et ainsi déterminer les conditions opératoires pour lesquelles les vitesses réactionnelles correspondent à des vitesses initiales (conditions non limitantes pour la réaction).

Pour cela, une expérience a été réalisée dans les conditions suivantes : VR 1 ml ; protéines 1,75 mg ; caféine 0,5 mM ; NADPH 0,5 mM ; $MgCl_2$ 2,5 mM ; tampon phosphate 50 mM, pH 7,8. La réaction a été conduite à 30°C, pendant 1 à 3 heures. Les quantités de caféine consommée en fonction de la durée de la réaction sont représentées dans la figure 7.1.

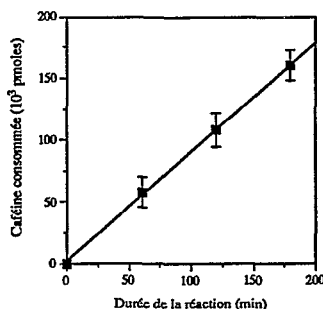


Figure 7.1 : Effet de la durée de la réaction enzymatique sur la consommation de la caféine dans le volume réactionnel (écart-type sur trois répétitions).

Dans ces conditions expérimentales (protéines 1,75 mg/VR), la quantité de caféine consommée au cours de la réaction est proportionnelle au temps d'incubation du volume réactionnel (Figure 7.1). La vitesse initiale de la réaction est alors de 885 pmol caf.min⁻¹, et l'activité déméthylasique est égale à 506 pmol caf.min⁻¹.mg⁻¹. Pour des temps réactionnels inférieurs à 1 heure, les quantités de caféine consommée sont trop faibles pour pouvoir être considérées comme significatives d'un point de vue statistique (écart-types importants sur les mesures). Ainsi, pour une concentration en protéines totales fixée et inférieure à 1,75 mg dans le volume réactionnel, l'activité caféine déméthylase d'un EIB d'*Aspergillus* V12A25 peut être déterminée pour des temps de réaction compris entre 1 et 3 heures.

Une expérience préliminaire a montré qu'entre 5 et 24 heures de réaction à 30°C, les quantités de théophylline et de 3-méthylxanthine issues de la dégradation de la caféine par un EIB d'*Aspergillus* V12A25 (protéines 1,0 mg/VR) restent identiques dans le mélange enzymatique. La caféine et le NADPH étant toujours présents après 24 heures de réaction, l'arrêt de celle-ci serait donc dû à une inactivation des décaféinases.

Sur la base de ces deux expériences, la décaféinase de l'extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25 ne semble donc plus active après 3 à 5 heures d'incubation à 30°C. Ainsi, dans le cas d'une simple mise en évidence qualitative de l'activité (cas de la recherche d'une fraction protéique active par exemple), il sera inutile de prolonger la réaction au delà de 5 heures d'incubation à 30°C.

7.3.4. Quantité d'extrait intracellulaire brut

Nous avons voulu déterminer la quantité minimale d'extrait intracellulaire brut (EIB) à déposer dans le volume réactionnel afin de travailler dans des conditions où la dégradation de la caféine est suffisamment importante pour être mesurable par CLHP, compte tenu de la sensibilité de la méthode employée.

Pour cela, des essais ont été réalisés sur un EIB contenant 3,84 mg.ml⁻¹ de protéines totales, et dans les conditions suivantes : VR 1 ml, dont EIB variant de 0,2 à 0,5 ml ; caféine 0,5 mM ; NADPH 0,5 mM ; MgCl₂ 2,5 mM ; tampon phosphate 50 mM, pH 7,8 ; réaction : 30°C - 2 h. Les activités déméthylasiques obtenues en fonction des quantités de protéines totales présentes dans le volume réactionnel sont représentées dans la figure 7.2.

Pour les quantités d'EIB de 0,2 à 0,4 ml/VR (soit moins de 1,8 mg de protéines totales/VR), les vitesses de consommation de la caféine correspondent dans ces conditions à des vitesses initiales, d'après les résultats du paragraphe 7.3.4. Pour la quantité maximale d'EIB utilisée dans cette expérience (0,5 ml soit 1,92 mg de protéines totales/VR), on considérera que la vitesse calculée correspond également à une vitesse initiale, car la réaction enzymatique a été stoppée après 2 heures d'incubation.

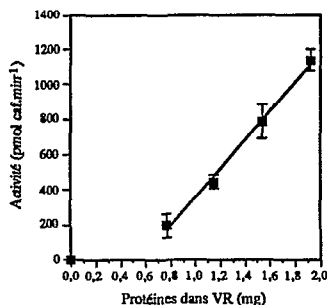


Figure 7.2 : Effet de la quantité de protéines totales présente dans le volume réactionnel sur l'activité caféine déméthylase (écart-type sur quatre répétitions).

Pour des quantités de protéines comprises entre 0,8 et 1,9 mg dans le volume réactionnel, il existe une relation linéaire entre l'activité caféine déméthylase et la quantité d'EIB.

Pour de plus faibles quantités de protéines, le dosage de l'activité enzymatique est rendu difficile et incertain, car l'écart des concentrations en caféine avant et après réaction ne peut être déterminé avec suffisamment de précision par la méthode utilisée.

L'activité caféine déméthylase d'un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25 ne semble s'exprimer pleinement que pour des volumes d'EIB supérieurs à 0,2 ml/VR. Ce phénomène peut être lié à :

- un problème d'instabilité du système enzymatique utilisé en faible quantité, ou dans un environnement "pauvre" en protéines. C'est le cas par exemple des activités homovanillate et vanillate *O*-déméthylases d'une souche de *Pseudomonas*, rapporté par TURNER et ALLISON (1995).
- une limitation d'un (ou de plusieurs) cofacteur différent du NADPH et du chlorure de magnésium, mais présent dans l'extrait intracellulaire brut. Cette hypothèse préfigure de résultats obtenus postérieurement, et présentés dans le paragraphe 7.5.1.2.

Pour la suite des travaux, et dans la mesure du possible, nous avons travaillé avec des teneurs en protéines totales comprises entre 1,0 et 1,8 mg dans le volume réactionnel ; équivalent à des quantités d'extrait intracellulaire brut supérieures à 0,2 ml. De plus, à chaque paramètre de la réaction étudié, un lot homogène d'extrait intracellulaire brut a été utilisé.

7.3.5. Nature des cofacteurs

Nous avons voulu connaître l'impact réel de l'addition du NADPH (ainsi que du chlorure de magnésium) sur l'activité caféine déméthylase, par rapport à d'autres cofacteurs de type nicotinamide adénine dinucléotide.

Pour cela, une expérience a été réalisée dans les conditions suivantes : VR 1 ml ; protéines 1,24 mg ; caféine 0,5 mM ; tampon phosphate 50 mM, pH 7,8 ; réaction 30°C - 3 h. Les cofacteurs suivant ont été testés : NAD 0,5 mM ; NADH 0,5 mM ; NADPH 0,5 mM ; NADPH 0,5 mM + MgCl₂ 2,5 mM ; ainsi qu'un essai sans cofacteur. Les activités déméthylasiques obtenues pour chaque essai sont données dans le tableau 7.3.

Tableau 7.3 : Effet de l'addition de cofacteurs sur l'activité caféine déméthylase (A.D.)
(écart-type sur trois répétitions).

Cofacteurs ajoutés	A.D. (pmol caf.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	% sur les moyennes
aucun	117 ± 30	100
NAD	251 ± 28	215
NADH	226 ± 33	193
NADPH	308 ± 38	263
NADPH + MgCl ₂	356 ± 42	304 *

* 116 % par rapport à NADPH seul

L'activité caféine déméthylase peut être mise en évidence dans un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25 sans ajout d'aucun cofacteur. Néanmoins, la présence de dérivés du β -nicotinamide adénine dinucléotide stimule la réaction enzymatique. Ainsi, le NADPH présente le plus fort effet activateur (+ 263 % en moyenne), plus important que celui du NADH. Toutefois, la forme réduite comme la forme oxydée du NAD présentent un effet activateur, mais à un degré moindre.

Il est vraisemblable que ces résultats soient liés à la nature même de l'extrait intracellulaire brut. En effet, celui-ci renferme toutes les protéines solubles ainsi que les métabolites cytoplasmiques initialement présents dans le mycélium. Il est alors possible que la forme oxydée soit rapidement réduite (ou inversement) pendant le temps de l'incubation, et puisse ainsi servir de cofacteur pour la réaction de *N*-déméthylation de la caféine. De même, la présence de ces cofacteurs dans l'EIB expliquerait la mise en évidence de l'activité déméthylasique dans l'essai témoin, sans cofacteur.

Enfin, le chlorure de magnésium ne présente qu'un faible et relatif effet activateur sur l'activité déméthylasique. Il est cependant possible que, dans le cas où la présence d'ions Mg^{2+} s'avérerait indispensable à la réaction enzymatique, les seules quantités de magnésium apportées par l'EIB soient suffisantes à l'activation de celle-ci. L'effet des cations sur l'activité sera plus précisément abordé dans le paragraphe 7.4.4.

A l'issue de cette étude, nous pouvons conclure que l'effet activateur de la forme phosphatée du β -nicotinamide adénine dinucléotide sur l'activité caféine déméthylase d'un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25 est supérieur à celui de la forme non phosphatée. Par contre, dans les conditions opératoires utilisées pour cette étude, les formes réduites et oxydées de ces composés stimulent de manière identique l'activité déméthylasique. Pour la suite des travaux, le NADPH ainsi que le chlorure de magnésium ont été conservés comme cofacteurs.

Afin de déterminer avec plus de certitude la forme biologiquement active, une étude sur l'effet de ces divers cofacteurs sera menée sur un extrait protéique brut, c'est-à-dire débarrassé des sels et autres molécules non protéiques (paragraphe 7.5.1.2.).

7.3.6. Optimisation du pH et de la température de la réaction

Pour conclure cette première partie sur l'étude des principaux paramètres influençant l'activité caféine déméthylase d'un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25, nous avons recherché les valeurs de pH et de température pour lesquelles cette activité est maximale.

Une première série d'essais a été menée pour déterminer le pH optimum de la réaction réalisée à 30°C. Des EIB ont été préparés dans les conditions décrites au paragraphe 3.7.1. ; seuls les tampons utilisés ont été différents pour chaque extrait : phosphate 50 mM, pH compris entre 6,50 et 8,00 ; Tris/HCl 50 mM, pH compris entre 8,00 et 9,00. Les autres conditions opératoires ont été les suivantes : VR 1 ml ; protéines 1,1 à 1,9 mg (suivant l'EIB) ; caféine 0,5 mM ; NADPH 0,5 mM ; $MgCl_2$ 2,5 mM ; tampons identiques à ceux des EIB ; réaction 30°C - 2 h.

A une température de 30°C, l'activité caféine déméthylase est maximale pour une valeur de pH de 7,4 dans le volume réactionnel (Figure 7.3-A). Elle apparaît assez sensible aux variations de pH puisque l'extrait intracellulaire brut perd 50 % de son activité à pH 7,0 et 8,0. Dans les conditions expérimentales de cette étude, la solution ayant permis d'atteindre le maximum d'activité enzymatique correspond en fait au tampon phosphate 50 mM, pH 7,6.

Nous avons en effet remarqué que les valeurs réelles de pH des extraits intracellulaires bruts, ainsi que celles des volumes réactionnels, sont toujours moins élevées que les valeurs de pH des tampons correspondant. La différence est d'autant plus marquée que le pH de la solution tampon est proche des limites de la gamme de pH couverte par cette solution (le pouvoir tampon étant dans ce cas moins important). Ce phénomène est probablement lié à une salinité relativement élevée, ou à une concentration importante de composés acides dans le liquide intracellulaire du champignon. D'après SMITH et BERRY (1975), le pH interne des champignons filamenteux est compris entre 5 et 6. L'augmentation de la force molaire de la solution tampon devrait atténuer ce phénomène.

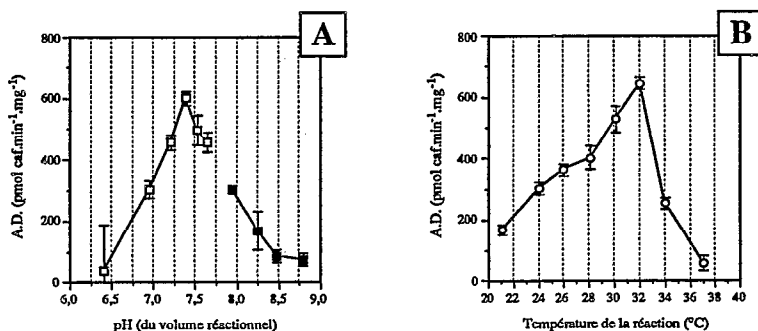


Figure 7.3 : Effets du pH (A, □ tampon phosphate, ■ tampon Tris/HCl) et de la température (B) sur l'activité caféine déméthylase (A.D.) (écart-types sur quatre répétitions).

Une deuxième série d'essais a été menée pour déterminer la température optimale de la réaction réalisée à partir d'un EIB conditionné en tampon phosphate 50 mM, pH 7,8. Les températures d'incubation ont été comprises entre 21 et 37 °C. Les autres conditions opératoires ont été les suivantes : VR 1 ml ; protéines 1,84 mg ; caféine 0,5 mM ; NADPH 0,5 mM ; MgCl_2 2,5 mM ; tampon phosphate 50 mM, pH 7,8 ; réaction 2 h.

Pour une valeur de pH de 7,5 environ dans le volume réactionnel, l'activité caféine déméthylase est maximale à une température comprise entre 30 et 32 °C (Figure 7.3-B). Cette activité est rapidement réduite pour des températures légèrement supérieures. Elle diminue de 60 % à 34 °C, et de 90 % à 37 °C. Inversement, pour des températures inférieures à 32 °C, l'activité décroît plus lentement. C'est pourquoi une température d'incubation de 30 °C a généralement été fixée par la suite, afin d'écartier tout risque d'inhibition de l'activité.

On notera le parallélisme entre l'effet de la température d'incubation sur l'activité caféine déméthylase d'un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* et celui obtenu sur la croissance du même champignon cultivé dans un milieu à base de caféine comme unique source d'azote (cf. Figure 6.1-A12, paragraphe 6.2.1.). Ainsi, l'optimum de température obtenue pour cette activité enzymatique (30-32°C), explique que le développement du champignon en milieu Caféine-Glucose soit optimal à une température de 30°C. De plus, l'importante réduction de l'activité caféine déméthylase à 35°C se traduit par une diminution des vitesses de dégradation de la caféine obtenues *in vivo* à cette température, ainsi qu'une abondante conidiogenèse (phénomène de stress). Cette dernière est vraisemblablement induite par une forte limitation en matière azotée directement assimilable par le microorganisme.

7.3.7. Définition des principales conditions opératoires

A partir des différentes études réalisées précédemment nous avons établi les principales conditions expérimentales permettant de suivre l'activité caféine déméthylase d'un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25. Afin de travailler en condition d'excès de substrat, et de s'assurer d'une vitesse de réaction constante pour une quantité de protéines totales donnée dans le volume réactionnel, on adoptera les conditions suivantes :

- VR 1 ml (en tampon phosphate 50 mM, pH 7,6*)
- Caféine 0,5 mM
- NADPH 0,5 mM
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2,5 mM
- Protéines totales 1,0 à 1,8 mg (EIB $\geq$ 0,2 ml/VR)
- pH de la réaction 7,3 à 7,5
- Température d'incubation 30 à 32°C
- Durée de la réaction 2 à 3 heures.

* l'utilisation d'un tampon phosphate 50 mM, pH 7,6 pour la récupération de l'extrait brut et pour la réaction enzymatique devrait permettre d'obtenir une valeur de pH dans le VR proche de 7,4.

Ces résultats se rapprochent de ceux décrits dans la littérature portant sur l'étude de l'activité caféine déméthylase de microsomes hépatiques et d'extraits intracellulaires bactériens. Seule la température optimale de la réaction enzymatique varie suivant le matériel enzymatique utilisé. Ainsi, pour toutes les études menées sur des microsomes hépatiques, une température de 37°C (correspondant à la température corporelle) est toujours utilisée pour les réactions enzymatiques (GRANT et coll., 1987 ; BERTHOU et coll., 1989 ; AGÚNDEZ et coll., 1992). Par contre, l'activité caféine déméthylase d'extraits cellulaires de deux souches de *Pseudomonas putida*, (cultivées entre 28 et 30°C) est optimale à une température comprise entre 22 et 25°C (HOHNLOSER et coll., 1980 ; ASANO et coll., 1994).

Les différences de températures optimales pourraient refléter un phénomène d'adaptation du système enzymatique à la niche écologique dont elle fait partie.

Par ailleurs, dans le cas de l'extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25, l'addition de cofacteur n'apparaît pas indispensable à la mise en évidence de l'activité déméthylasique, alors que pour des extraits bruts de *Pseudomonas putida*, l'ajout de NADH ou de NADPH indifféremment est essentielle à la réaction de déméthylation (HOHNLOSER et coll., 1980 ; GLÜCK et LINGENS, 1988). Néanmoins, dans notre cas, l'addition de ces deux mêmes cofacteurs dans le volume réactionnel permet d'augmenter très sensiblement l'activité enzymatique ; la forme phosphatée présentant un meilleur effet activateur que la forme non phosphatée. Par contre, nous n'avons pas pu déterminer avec certitude laquelle des deux formes réduite ou oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate représente la forme biologiquement active. L'analyse bibliographique révèle cependant que l'ensemble des systèmes enzymatiques catalysant des réactions de déméthylation sont dépendants de cofacteurs réduits tels le NADPH, notamment lorsque ces systèmes impliquent des cytochromes P-450 (Tableau 7.4).

Tableau 7.4 : Exemples de réactions de déméthylation par des systèmes eucaryotes.

Substrats	Cofacteurs réduits	Systèmes enzymatiques	Types de déméthylation	Références bibliographiques
1,1-bis-(4-méthoxyphényl)-2,2,2-trichloroéthane (methoxychlor)	NADPH	Microsomes hépatiques de rats ou isoenzymes de CYP* purifiées (associées à une NADPH-CYP réductase)	O-déméthylation	KISHIMOTO et coll. (1995)
diméthyl 3-méthyl-4-nitro-phényl-phosphorothionate (fenitrothion)	Glutathione (GSH)	Glutathione S-transférases (iso-enzymes) de fraction cytosolique du foie de souris	O-déméthylation	WAKABAYASHI et coll. (1994)
4-diméthylaminoantipyrine (aminopyrine)	NADPH	Microsomes hépatiques humains et de rats	N-déméthylation	AGÚNDEZ et coll. (1992)
dextrométhorphan et 6,7-diméthoxycoumarine	NADPH	Microsomes hépatiques humains	O-déméthylation	BERTHOUD et coll. (1989)
4-diméthylaminoantipyrine (aminopyrine)	NADPH	Microsomes de <i>Helianthus tuberosus</i> (contenant des CYP)	N-déméthylation	FONNE-PFISTER et coll. (1988)
lanosterol	NADPH	Microsomes de <i>S. cerevisiae</i> ou CYP purifié (associé à une NADPH-CYP réductase)	C-déméthylation	AOYAMA et coll. (1984)
pisatine	NADPH	Microsomes de <i>Nectria haematococca</i> (contenant des CYP)	O-déméthylation	MATTHEWS et VAN ETTEN (1983)
4-diméthylaminoantipyrine et p-nitroanisole	NADPH	Microsomes de <i>Saccharomyces uvarum</i> (contenant des CYP)	N-déméthylation	SAUER et coll. (1982)

* CYP : cytochrome P-450

7.4. EFFETS DE DIVERS PARAMETRES SUR L'ACTIVITE CAFEINE DEMETHYLASE

Nous venons d'établir les principales conditions opératoires de la mise en évidence de l'activité caféine déméthylase sur des extraits intracellulaires bruts d'*Aspergillus* V12A25. Dans les études qui suivent, nous avons évalué qualitativement les effets activateurs ou inhibiteurs de certaines conditions expérimentales et de divers effecteurs sur cette activité. Pour cela, le test de visualisation de l'activité déméthylasique par chromatographie sur couche mince a été largement utilisé (paragraphe 3.6.).

Comme dans le cas de l'analyse par CLHP, les principaux produits de la réaction visualisés par CCM correspondent à la théophylline et à la 3-méthylxanthine. L'évaluation de l'activité enzymatique est alors fonction de l'apparition de ces deux métabolites ainsi que de l'intensité des taches observées sous lumière ultra-violette.

Sauf indication contraire, tous les essais enzymatiques ont été conduits dans les conditions décrites précédemment et rappelées dans le paragraphe 3.7.2.

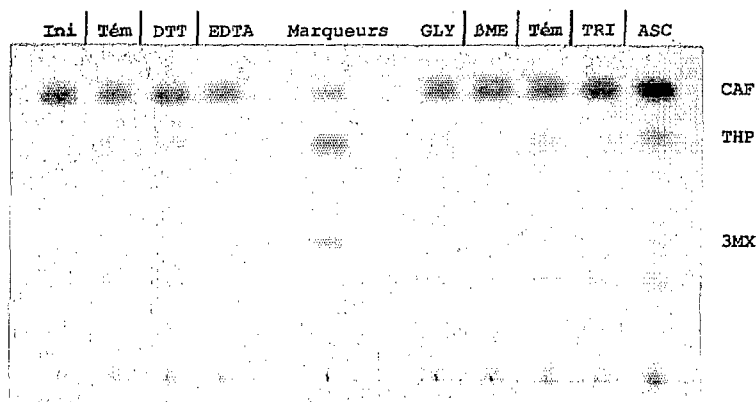
7.4.1. Effet de divers protecteurs d'enzymes

Au cours de l'étude d'activités déméthylasiques, certains auteurs ont incorporé au tampon d'extraction, diverses substances protectrices d'enzymes. Nous avons voulu vérifier l'effet de certaines d'entre elles sur l'activité caféine déméthylase d'*Aspergillus* V12A25. Les substances additionnées au volume réactionnel à deux concentrations ont été les suivantes :

EDTA :	0,5 et 2 mM
Acide L(+)-ascorbique :	1 et 5 mM
DL-dithiothréitol :	0,1 et 1,0 mM
Mercapto-2-éthanol :	0,5 et 2 mM
Glycérol :	5 et 20 % (p/v)
Triton X-100 :	0,01 et 0,05 % (v/v)

Les deux niveaux d'utilisation des différents composés testés donnent les mêmes résultats, c'est pourquoi seuls les chromatogrammes correspondant aux concentrations les moins élevées sont présentés dans la figure 7.4.

L'acide ascorbique et le dithiothréitol (DTT) ont un effet activateur sur la réaction enzymatique ; l'intensité des taches correspondant à la théophylline et à la 3-méthylxanthine étant plus importantes que dans l'essai témoin. Le glycérol n'a pas d'effet. Enfin, le triton X-100, le mercapto-éthanol (BME) et l'EDTA ont dans cet ordre un effet inhibiteur croissant sur l'activité caféine déméthylase d'un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25.



Légende : Ini : sans réaction, Tém : témoin sans adjuvant, DTT : dithiothréitol, EDTA : ac. diéthylènediamine-tétracétique, GLY : glycérol, BME : mercapto-2-éthanol, TRI : triton X-100, ASC : acide ascorbique, CAF : caféine, THP : théophylline, 3MX : 3-méthylxanthine.

Figure 7.4 : Effet de protecteurs d'enzymes sur l'activité caféine déméthylase.

L'addition d'une molécule antioxydante comme l'acide ascorbique a un effet bénéfique sur l'activité caféine déméthylase. De même, le DTT (antioxydant des groupements -SH) a un effet bénéfique sur cette activité, à l'inverse du BME. Le glycérol n'a pas d'effet sur la réaction enzymatique et pourrait de ce fait être incorporé à l'extrait intracellulaire brut pour améliorer sa stabilité. Enfin, l'EDTA présente un fort effet inhibiteur sur l'activité caféine déméthylase, présumant de ce fait l'intervention d'un cation (Mg^{2+}) dans la réaction comme cofacteur ou inclu dans l'enzyme responsable de la transformation de la caféine.

Dans un premier temps, nous avons donc choisi de poursuivre tous les travaux en ajoutant de l'acide ascorbique à 1 mM au milieu réactionnel. Mais des problèmes de stabilité du composé nous ont rapidement fait préférer l'utilisation du dithiothréitol à 0,1 mM.

7.4.2. Thermostabilité de l'extrait intracellulaire brut

Nous avons voulu tester le comportement de l'extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25 vis-à-vis de la température, afin d'établir les meilleures conditions de conservation de l'activité déméthylasique.

7.4.2.1. Congélation / Lyophilisation

Ces deux méthodes sont largement utilisées pour la conservation d'extraits enzymatiques ; la lyophilisation permettant par ailleurs de les concentrer. Il était cependant important de s'assurer que ces modes de conservation ne dénaturaient pas les propriétés de l'EIB, traité par ailleurs sans addition de substance cryoprotectrice.

Un extrait intracellulaire brut fraîchement préparé dans les conditions standards (tampon phosphate 50 mM pH 7,6 + DTT 0,1 mM) a été réparti en trois lots. Deux lots ont été rapidement congelés (azote liquide) et le troisième a été immédiatement testé. L'un des deux lots congelés a été maintenu à -80°C pendant 24 heures et l'autre a été lyophilisé pendant 20 heures, avant d'être tous deux testés dans les mêmes conditions que le lot témoin.

Il ressort de l'analyse chromatographique par CCM que les deux modes de conservation n'ont pas d'influence significative sur l'activité caféine déméthylase de l'extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25, car les taches de théophylline et de 3-méthylxanthine ont les mêmes intensités pour chacun des trois lots traités.

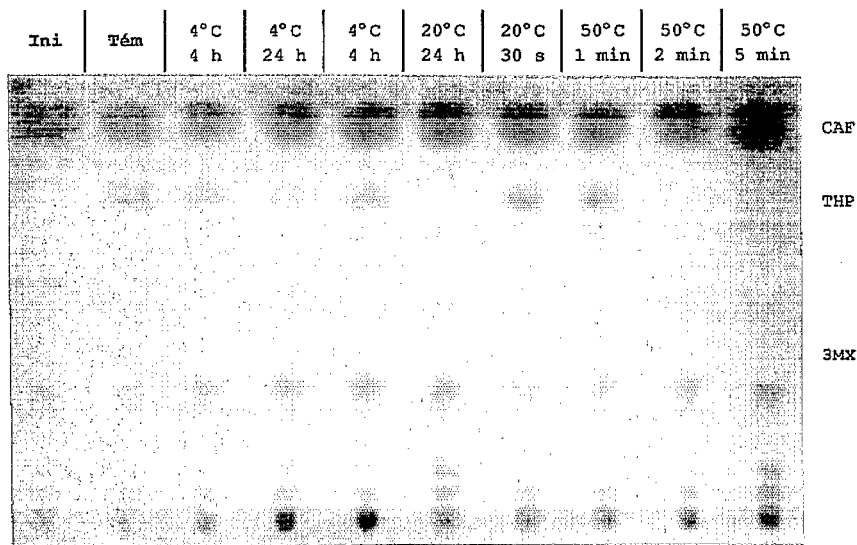
Par ailleurs, une autre expérience a montré que l'activité caféine déméthylase d'un extrait intracellulaire brut ne perd que 10 à 15 % de son activité initiale dès le premier jour de congélation à -80°C (sans cryoprotecteur), et qu'après 2 semaines, le niveau d'activité de l'EIB reste identique.

7.4.2.2. Températures supérieures à 0°C

Nous avons testé la stabilité d'un extrait intracellulaire brut produit en tampon phosphate 50 mM, pH 7,6 + DTT 0,1 mM, aux températures positives. Pour cela, nous avons séparé l'EIB en quatre lots :

- un lot témoin sur lequel la réaction enzymatique a été réalisée juste après la production de l'EIB.
- un lot conservé à 4°C à l'abri de la lumière, et testé après 4 et 24 h.
- un lot conservé à température ambiante à l'abri de la lumière, et testé après 4 et 24 h.
- un lot incubé à 50°C, et testé après 30 sec, 1, 2 et 5 min.

L'activité caféine déméthylase d'un EIB est relativement stable lorsque la préparation est maintenue à 4°C pendant 4 heures (Figure 7.5). Mais dans le même temps, elle diminue de moitié environ lorsque l'extrait est maintenu à température ambiante ($\approx$ 22°C). Après 24 heures de conservation à ces deux températures, l'activité enzymatique résiduelle est faible pour une température de 4°C, et nulle pour une température de 22°C. Par ailleurs, l'EIB perd toute activité après une incubation de 2 minutes à 50°C.



Légende : Ini : sans réaction, Tém : témoin sans incubation de l'extrait intracellulaire brut,
CAF : caféine, THP : théophylline, 3MX : 3-méthylxanthine.

Figure 7.5 : Sensibilité de l'activité caféine déméthylase aux températures positives.

L'activité caféine déméthylase contenue dans un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25 apparaît donc assez thermosensible. Cependant, on n'écartera pas l'hypothèse de la présence d'une activité protéolytique au sein de l'extrait intracellulaire brut pour expliquer la rapide diminution de l'activité à température ambiante notamment. L'implication d'un tel phénomène est cependant limitée par le fait que la biomasse utilisée pour produire l'extrait brut est récupérée au moment où le champignon est en pleine phase de croissance.

7.4.3. Nature et force molaire de la solution tampon

Nous avons voulu comparer l'efficacité des deux solutions tampon les plus utilisées pour la production d'extraits protéiques présentant une activité caféine déméthylase (tampons phosphate et Tris/HCl), ainsi que l'effet de la force molaire de ces solutions sur l'activité caféine déméthylase d'extraits intracellulaires bruts d'*Aspergillus* V12A25.

Deux EIB ont alors été produits dans des conditions similaires, l'un en utilisant un tampon phosphate 50 mM, pH 7,6 + DTT 0,1 mM, et l'autre en utilisant un tampon Tris/HCl 50 mM, pH 7,6 + DTT 0,1 mM.

Des essais enzymatiques ont été réalisés dans les conditions standards (protéines ≈ 1 mg/VR pour chaque extrait brut) en ajoutant des quantités croissantes de tampon phosphate ou Tris à 1 M, pH 7,4 + DTT 0,1 mM, de manière à obtenir des concentrations en sels de 50 à 500 mM dans les volumes réactionnels. Les réactions enzymatiques ont été réalisées à 30°C pendant 3 h 30 pour les essais en tampon phosphate, et pendant 4 h 00 pour les essais en tampon Tris.

Les résultats de l'analyse par CCM montrent que plus la force molaire des tampons augmente, plus l'activité caféine déméthylase est inhibée (diminution de l'intensité des taches de théophylline et de 3-méthylxanthine), celle-ci devenant nulle entre 200 et 300 mM. L'activité enzymatique de l'extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* apparaît donc relativement sensible aux effets des sels.

D'autre part, l'absence de tache correspondant à la 3-méthylxanthine, ainsi que la plus faible intensité des taches de théophylline dans le cas de l'utilisation du tampon Tris/HCl, par rapport au tampon phosphate, ont permis de conforter notre choix initial d'utiliser un tampon phosphate plutôt qu'un tampon Tris pour la production d'extraits bruts d'*Aspergillus* V12A25.

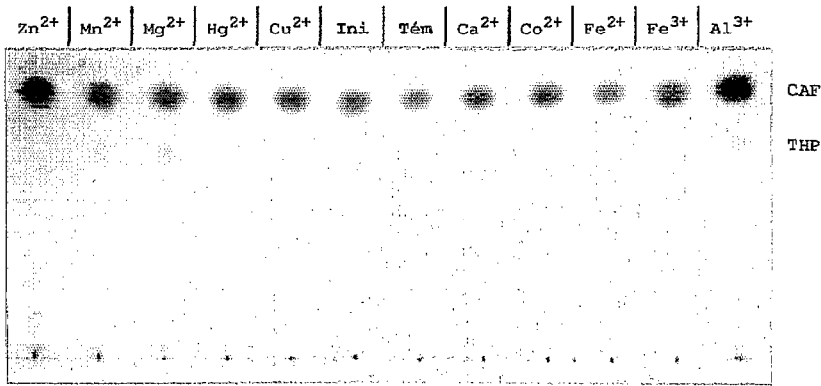
Afin de pallier aux variations de pH observées entre la solution tampon et l'extrait intracellulaire brut lors de l'étude de l'effet du pH sur l'activité enzymatique (paragraphe 7.3.6.), nous avons pensé augmenter la force molaire du tampon. Les résultats de la présente étude, démontrent les risques d'une telle modification. C'est pourquoi, nous avons conservé par la suite la même molarité (50 mM) pour le tampon d'extraction du liquide intracellulaire du champignon.

7.4.4. Influence des cations

Nous avons voulu déterminer les effets de certains cations sur l'activité caféine déméthylase d'un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25, afin notamment de les comparer aux effets définis lors de l'étude de l'influence des oligoéléments sur le développement de ce champignon cultivé en milieu Caféine-Saccharose (paragraphe 6.2.4.).

L'effet de dix cations sur l'activité caféine déméthylase d'un extrait intracellulaire brut produit en tampon phosphate 50 mM, pH 7,6 (sans DTT) a été évalué à l'aide d'un test enzymatique réalisé dans les conditions standards. Les sels minéraux additionnés au volume réactionnel en concentrations équimolaires à celle de la caféine (0,5 mM) ont été les suivants :

MgCl ₂ .6H ₂ O	CaCl ₂ .2H ₂ O
MnCl ₂ .4H ₂ O	CoCl ₂ .6H ₂ O
FeSO ₄ .7H ₂ O	FeCl ₃
ZnCl ₂ .7H ₂ O	AlCl ₃ .6H ₂ O
CuSO ₄	HgCl ₂



Légende : Ini : sans réaction, Tém : témoin sans cation, CAP : caféine, THP : théophylline.

Figure 7.6 : Effet de divers cations sur l'activité caféine déméthylase.

Aucun ions ne présente de fort effet activateur sur l'activité caféine déméthylase d'un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25, aux concentrations utilisées dans cette expérience (Figure 7.6). Seuls les ions Mg^{2+} et Fe^{2+} semblent avoir un léger effet positif. Les ions Fe^{3+} et Ca^{2+} n'ont pas d'effet sur l'activité, et les ions Al^{3+} et Mn^{2+} ont un effet légèrement négatif. Par contre, les ions Cu^{2+} et surtout Zn^{2+} , Co^{2+} et Hg^{2+} présentent un fort effet inhibiteur sur l'activité caféine déméthylase.

Ces résultats confirment le léger effet activateur de l'ion magnésium observé au paragraphe 7.3.5. On retrouve également certains des effets positifs ou négatifs d'oligoéléments, notés lors de l'étude de l'influence de ces éléments traces sur la dégradation *in vivo* de la caféine par les deux champignons filamenteux (paragraphe 6.2.4.). Ainsi pour *Aspergillus* V12A25, les présents résultats confirment l'effet positif du fer et l'effet négatif du cobalt sur la dégradation de la caféine. Par contre, une différence notable apparaît entre les deux expériences concernant les effets du zinc et du cuivre ; ces deux ions se montrant ici des inhibiteurs de l'activité enzymatique. L'effet positif de ces deux ions observé *in vivo* (cf. Figure 6.7, paragraphe 6.2.4.2.) serait alors lié à la croissance et au métabolisme général du microorganisme, et non à un effet activateur de la déméthylation de la caféine.

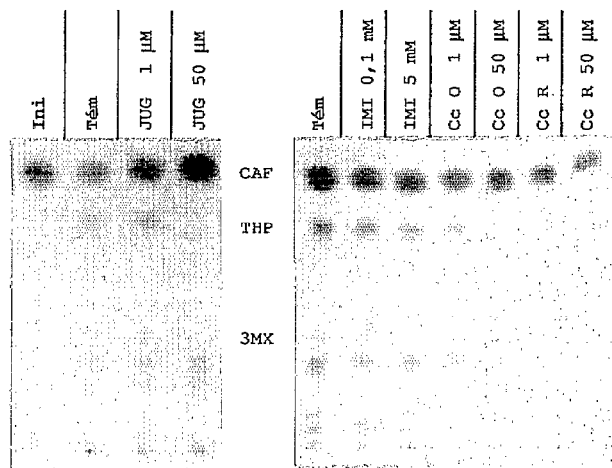
7.4.5. Effet d'inhibiteurs de cytochromes P-450

L'effet de divers inhibiteurs plus ou moins spécifiques aux cytochromes P-450 a été déterminé dans le but d'évaluer si l'activité déméthylasique pourrait être le fait d'une enzyme appartenant à cette famille. Ces inhibiteurs ont notamment été utilisés par BERG et coll. (1975), CLEMENS et coll. (1993) et LIU et ROSAZZA (1993).

Les différents composés testés dans les conditions standards de la réaction de déméthylation de la caféine, et ajoutés au volume réactionnel à deux concentrations, ont été les suivants :

Métyrapone (SIGMA M.1259) :	100 et 5000 μM	(cf. annexe 3)
Juglone (SIGMA J.0500) :	1 et 50 μM	
Imidazole (SIGMA I.0125) :	100 et 5000 μM	
Cytochrome c (forme oxydée) (SIGMA C.2506) :	1 et 50 μM	
Cytochrome c (forme réduite) (SIGMA C.3256) :	1 et 50 μM	

Les deux premiers composés ont été testés sur un premier extrait intracellulaire brut, et les trois derniers sur un deuxième EIB. Les résultats concernant l'effet de la métyrapone ne peuvent être exploités car la molécule se dégrade en plusieurs composés au cours de l'étape d'extraction/concentration des méthylxanthines, qui interfèrent avec la lecture de la théophylline. Les chromatogrammes de ces essais sont représentés sur la figure 7.7.



Légende : Ini : sans réaction, Tém : témoins sans inhibiteur, JUG : juglone, IMI : imidazole, Cc O : cytochrome c forme oxydée, Cc R : cytochrome c forme réduite.

Figure 7.7 : Effet d'inhibiteurs de cytochromes P-450 sur l'activité caféine déméthylase.

L'imidazole ne présente pas d'effet inhibiteur pour une concentration dans le volume réactionnel comprise entre 0,1 et 5 mM. De même, à une concentration de 1 μ M, les deux formes de cytochrome *c* et la juglone n'ont pas d'effet inhibiteur. Par contre, à 50 μ M, ces composés inhibent la réaction enzymatique ; l'inhibition apparaissant totale dans le cas de la juglone.

Ces résultats sembleraient démontrer une certaine analogie entre le comportement de l'activité caféine déméthylase d'*Aspergillus* V12A25 et celui des cytochromes P-450 (CYP). Cependant, dans notre cas cette activité est moins sensible à ces inhibiteurs que dans les divers cas cités dans la littérature. Ainsi, une activité isoflavone hydroxylase liée à un CYP microsomal, est inhibée à 50 % par le cytochrome *c* et la juglone présents à 1 μ M, pour 100 μ M de substrat et 50 à 100 μ g de protéines microsomaes (CLEMENS et coll., 1993). D'autres tests plus spécifiques (comme l'inhibition par le monoxyde de carbone) devront donc être réalisés pour confirmer ou infirmer la présence et l'implication d'isoformes de CYP dans la déméthylation de la caféine par l'extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25.

7.4.6. Bilan des essais enzymatiques complémentaires

L'évaluation des effets de divers paramètres expérimentaux sur l'activité caféine déméthylase d'un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25 ont permis dans un premier temps de mettre en évidence les problèmes de stabilité et de conservation de cette activité. Nous avons ainsi démontré que l'acide ascorbique et le dithiothréitol stimulent l'activité déméthylasique. Cependant, malgré la présence de ces substances protectrices, l'activité caféine déméthylase de l'extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25 apparaît relativement instable du fait de sa sensibilité à la température comme à l'élévation de la force molaire. La lyophilisation et la congélation se présentent toutefois comme de bonnes méthodes de conservation des EIB.

D'une manière générale, l'instabilité des activités déméthylasiques de microorganismes, comme la difficulté à les mettre en évidence dans des extraits intracellulaires, ont souvent été soulignées (GUAN et coll., 1992 ; TURNER et ALLISON, 1995). L'instabilité de l'activité caféine déméthylase a également été rapportée pour les extraits intracellulaires de *Ps. putida* (HOHNLOSER et coll., 1980 ; ASANO et coll., 1994). Ainsi, GLÜCK et LINGENS (1988) n'ont pu mettre en évidence que l'activité 7-méthylxanthine déméthylase dans un extrait intracellulaire de *Ps. putida* WS, pourtant cultivé sur caféine. Ces auteurs ont montré que cet extrait perdait 94 % de son activité après 24 heures à +4°C. Néanmoins, l'addition au tampon d'extraction de divers agents protecteurs comme le glycérol, la BSA, le dithiothréitol ou le dithioérythritol permettait, selon ces mêmes auteurs, de stabiliser cet extrait et d'augmenter son activité spécifique.

D'autre part, l'étude de l'effet des cations sur l'activité caféine déméthylase de l'extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25 montre qu'aucun élément ne possède un réel effet activateur, alors que le cuivre, le cobalt, le zinc et le mercure (ions divalents) sont fortement inhibiteurs de cette activité. L'effet inhibiteur de l'EDTA (agent chélateur) suggère néanmoins l'implication d'un cation dans le système enzymatique responsable de la déméthylation de la caféine. Ce cation agirait soit en tant que cofacteur, soit en tant qu'élément inclu dans la structure d'une enzyme impliquée dans ce système, comme dans le cas des cytochromes P-450 (présence de fer).

HOHNLOSER et coll. (1980) ont obtenu des résultats contradictoires sur des extraits intracellulaires de *Ps. putida* C1. En effet, l'activité caféine déméthylase de cette souche est stimulée en présence de cobalt, tandis que le zinc et le cuivre ne modifient pas cette activité. De la même manière, ASANO et coll., 1994 ont montré que le zinc ne présente aucun effet sur l'activité caféine déméthylase de *Ps. putida* No. 352. Ces observations démontrent que les systèmes enzymatiques responsables de la déméthylation de la caféine chez *Aspergillus* V12A25 et chez *Pseudomonas putida* sont différents.

7.5. PURIFICATION PRELIMINAIRE DES DEMETHYLASES

Toutes les études de l'activité caféine déméthylase ont été réalisées jusqu'à présent à partir d'extraits intracellulaires bruts d'*Aspergillus* V12A25. Or, les effets de certains paramètres (cofacteurs réduit, cations...) ont été masqués à cause de la nature même des extraits utilisés. En effet, outre les protéines cytoplasmiques, ces extraits contiennent de nombreux métabolites initialement présents dans le cytoplasme du champignon, et susceptibles d'interférer avec les paramètres étudiés.

Nous avons donc cherché à isoler la fraction protéique totale de l'extrait intracellulaire brut, afin notamment de pouvoir confirmer certains aspects de l'activité caféine déméthylase d'*Aspergillus* V12A25, déterminés précédemment. Cette première opération devait également servir d'étape préliminaire à tout essai de séparation des protéines par chromatographie.

Les fractions protéiques obtenues ont ensuite été testées pour leur aptitude à dégrader la caféine (paragraphe 3.7.2.). Dans la plupart des cas, l'activité caféine déméthylase a été mise en évidence à l'aide de la technique d'analyse des méthylxanthines par chromatographie sur couche mince (paragraphes 3.6.1.2. et 3.6.2.).

7.5.1. Séparation des fractions protéiques et salées

7.5.1.1. Essais préliminaires

Nous avons testé dans un premier temps diverses techniques classiques d'isolement de la fraction protéique d'un extrait intracellulaire brut. Il s'agissait de la dialyse (paragraphe 3.8.1.1.) de l'ultrafiltration sur microconcentrateurs (paragraphe 3.8.1.2.) et enfin de la précipitation au sulfate d'ammonium (paragraphe 3.8.2.) suivie d'un dessalage par dialyse.

Appliquées à un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus*, aucune de ces techniques n'a permis de conserver une activité enzymatique satisfaisante.

- Cas de la dialyse

Dans le cas de la dialyse (seuil de coupure 10 kDa), l'activité caféine déméthylase de la fraction protéique récupérée apparaît faible par rapport à celle du même EIB maintenu à +4°C pendant le temps de la dialyse. L'addition de DTT à 0,1 mM ou d'acide ascorbique à 1 mM au tampon de dialyse (phosphate 50 mM, pH 7,4) n'améliore pas l'activité résiduelle de la fraction protéique. De même, l'addition de divers cations (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}) ou d'un mélange NADPH + NADH + ATP ne permettent pas de rétablir l'activité initiale.

- Cas de l'ultrafiltration sur microconcentrateurs

L'utilisation de tels systèmes de séparation ne semble pas envisageable sur des extraits intracellulaires bruts à cause d'un problème de colmatage important des membranes filtrantes au cours de la centrifugation. Ainsi, sur des membranes présentant des seuils de perméabilité allant jusqu'à 300 kDa, la quasi totalité de l'EIB est retenue. La quantité de protéines se retrouvant dans le faible volume de filtrat est négligeable et ne présente pas d'activité caféine déméthylase.

- Cas de la précipitation au sulfate d'ammonium

Aucune fraction protéique obtenue par précipitation fractionnée d'un EIB au sulfate d'ammonium n'a montré, après dialyse, d'activité caféine déméthylase dans les conditions standards.

Le système enzymatique responsable de la dégradation de la caféine apparaît donc sensible à tous ces traitements. Les mauvais comportements de l'EIB peuvent s'expliquer en partie :

- par sa mauvaise stabilité aux températures positives (décrite au paragraphe 7.4.2.2.) ; ce qui expliquerait la baisse d'activité après dialyse,
- par sa sensibilité aux salinités élevées (décrite aux paragraphes 7.4.3.) ; ce qui expliquerait la perte d'activité après précipitation au sulfate d'ammonium (effet dénaturant du sel sur les décaféinases),
- par la disparition d'un cofacteur non identifié (différent du NADPH), mais initialement présent dans l'extrait intracellulaire brut.

Nous avons donc rechercher une autre méthode de séparation, rapide et ne faisant pas intervenir une phase de précipitation des protéines par un quelconque adjuvant.

7.5.1.2. Séparation sur colonne de dessalage

Nous avons utilisé une colonne de dessalage "PD-10" (PHARMACIA) contenant 9,1 ml de gel Sephadex G-25 (limites d'exclusion 1-5 kDa). Ce système permet de séparer la fraction protéique totale de la fraction "salée" en limitant les effets de dilution pour ces deux fractions.

Le tampon d'équilibre et d'élution a été le tampon phosphate 20 mM, pH 7,4 + DTT 0,1 mM. Nous avons diminué la molarité de la solution tampon (de 50 à 20 mM) afin de limiter les problèmes d'inhibition de l'activité caféine déméthylase liés à l'élévation de la force molaire (paragraphe 7.4.3.).

La séparation des protéines de la fraction salée a été optimisée de manière à récupérer une seule fraction protéique renfermant 90 à 100 % des protéines totales initialement déposées à la surface du gel. La méthodologie mise au point est décrite dans le paragraphe 3.8.1.3. Elle permet de récupérer deux fractions (protéique et salée) de 3 ml chacune à partir de 1 ml d'extrait intracellulaire brut.

Les premiers tests enzymatiques ont montré que la fraction protéique seule, avec ou sans NADPH et Mg^{2+} comme cofacteurs ne présente aucune activité caféine déméthylase. Par contre, l'addition au volume réactionnel de la fraction salée permet de récupérer en grande partie l'activité initiale de l'EIB.

Ainsi, contrairement à la plupart des cas cités dans la littérature, le système enzymatique responsable de la *N*-déméthylation de la caféine chez *Aspergillus* V12A25 semble dépendant d'un cofacteur différent ou complémentaire du NADPH, et différent de l'oxygène.

Quelques essais supplémentaires ont été menés afin de définir la nature de ce cofacteur inconnu. Il a été démontré que :

- la thermosensibilité de l'activité enzymatique est le fait de la (des) enzyme(s) impliquée(s) et non celui du cofacteur inconnu : l'activité caféine déméthylase n'est pas inhibée en associant la fraction protéique à une fraction salée pré-traitée 5 min. à 50°C, alors qu'elle disparaît sur un EIB traité 2 min. à 50°C (paragraphe 7.4.2.2.)
- l'addition de NADPH, de NADH et de vitamines (biotine, riboflavine, thiamine) à la fraction protéique ne permet pas de récupérer l'activité déméthylasique.
- l'addition de Mg^{2+} , Ca^{2+} , ou de Mn^{2+} combinée au NADPH ne permet pas de mettre en évidence l'activité caféine déméthylase sur la fraction protéique d'un EIB d'*Aspergillus* ; par contre, l'association NADPH + Fe^{2+} permet de rétablir faiblement cette activité.

A ce stade des travaux, la nature exacte du cofacteur inconnu n'a pas pu être déterminée, et nous n'avons pas poursuivi nos investigations sur ce sujet. Il semble néanmoins que le fer joue un rôle important dans la dégradation *in vitro* de la caféine. On peut également émettre l'hypothèse que l'élément manquant du système enzymatique correspond à un accepteur de groupements méthyles. Enfin, il est vraisemblable que la masse moléculaire de ce composé soit inférieure à 5 kDa ; valeur correspondant à la limite supérieure d'exclusion du gel utilisé.

On notera que les problèmes soulevés au cours de cette étude expliqueraient en partie les pertes d'activité enregistrées précédemment sur des extraits dialysés ou fractionnés par précipitation au sulfate d'ammonium.

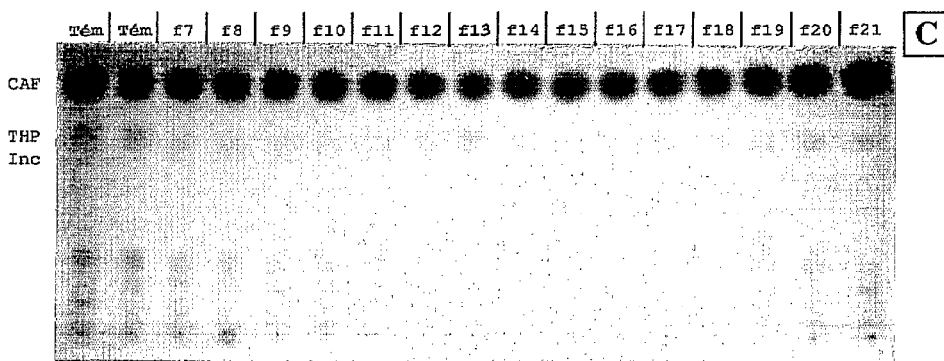
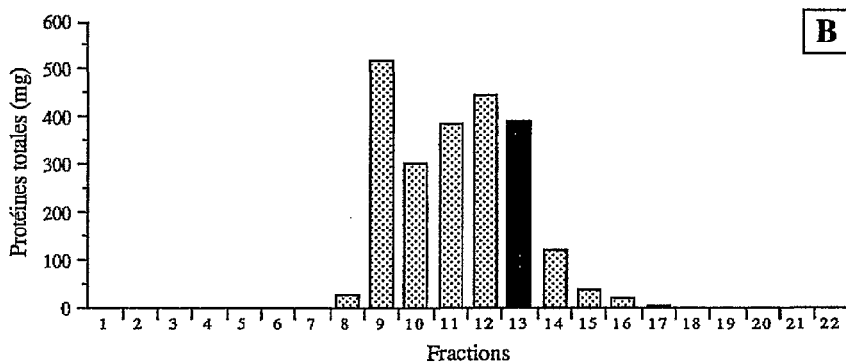
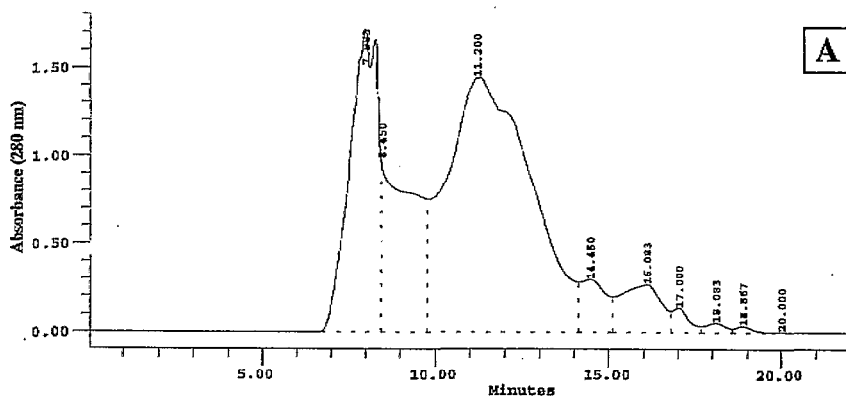
Par la suite, nous avons ajouté directement cette fraction salée au volume réactionnel, en combinaison avec le NADPH, pour la mise en évidence de l'activité caféine déméthylase sur des fractions protéiques d'extraits intracellulaires bruts, séparées par chromatographie de gel filtration.

7.5.2. Séparation des protéines par gel filtration

Nous avons choisi comme première approche pour la séparation des protéines d'un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25, la technique de chromatographie en gel filtration, bien que cette technique ne soit généralement pas utilisée comme première étape de purification de protéines à cause des effets de dilution qu'elle entraîne sur l'échantillon analysé. Cependant, cette technique est généralement considérée comme la moins dénaturante pour les protéines car elle ne fait pas intervenir de contraintes particulières comme l'augmentation de la salinité lors de l'élution des protéines. L'activité caféine déméthylase d'*Aspergillus* V12A25 étant assez sensible à divers paramètres physico-chimiques, la technique de gel filtration nous est donc apparue comme la plus propice à maintenir actives la (les) enzyme(s) responsable(s) de cette activité.

Plusieurs essais ont été menés dans les conditions décrites au paragraphe 3.8.3. Brièvement, on rappellera que la séparation est réalisée à l'aide d'un système automatisé, sur une colonne contenant 15 ml de gel (limites d'exclusion : 10-300 kDa). Le tampon d'équilibrage et d'élution est un tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 + DTT 0,1 mM. Les échantillons traités ont été soit des extraits intracellulaires bruts lyophilisés, soit des fractions protéiques de ces extraits, obtenues après une gel filtration sur PD-10, puis lyophilisées. Les quantités de protéines totales déposées à raison de 100 µl sous forme de suspensions concentrées, ont été comprises entre 2,5 et 3,0 mg.

Les premiers essais ont permis de vérifier la bonne reproductibilité de la séparation, par comparaison des profils chromatographiques de densité optique (280 nm) enregistrés pour plusieurs injections d'un même extrait.



Légende : Tém : extrait avant séparation, f : fraction protéique, CAF : caféine, THP : théophylline, Inc : molécule inconnue (contaminant).

Figure 7.8 : Séparation des protéines d'un extrait intracellulaire d'*Aspergillus* V12A25 par chromatographie d'exclusion. Profil spectrophotométrique à 280 nm (A), teneurs en protéines totales des fractions (B), activités caféine déméthylase des fractions 7 à 21 (C).

Les résultats d'une séparation réalisée sur la fraction protéique lyophilisée d'un EIB sont présentés dans la figure 7.8. Environ 2,5 mg de protéines totales ont été déposées en tête de colonne. Une recherche de l'activité caféine déméthylase a été réalisée sur toutes les fractions protéiques obtenues après élution (analyse qualitative par CCM). Les conditions suivantes ont été appliquées : VR 1 ml ; fraction protéique 600 µl/VR ; caféine 0,2 mM ; NADPH 0,2 mM ; fraction salée 300 µl/VR ; tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 + DTT 0,1 mM ; réaction : 30°C - 4 h. Un essai témoin a été réalisé dans les mêmes conditions sur 20 µl/VR de l'extrait protéique injecté.

L'activité caféine déméthylase (apparition de théophylline) se situe principalement dans la fraction protéique n°13 ; les fractions n°12 et 14 présentant une activité mineure (Figure 7.8-C). Des essais réalisés à partir d'autres extraits protéiques ont montré par la suite les mêmes résultats.

La fraction n°13 représente en moyenne $17,8 \pm 0,8$ % des protéines totales récupérées après séparation sur ce type de colonne et dans les conditions définies au paragraphe 3.8.3. Par ailleurs, le pourcentage de recouvrement des protéines totales injectées est supérieur à 90 % dans tous les cas ; l'ensemble des protéines étant réparties dans une dizaine de fractions.

Enfin, le poids moléculaire des protéines de la fraction n°13 a pu être estimé par comparaison à des profils d'élution de quelques molécules étalons. Ce poids est compris entre 20 et 45 kDa.

7.5.3. Bilan des essais de séparation des protéines

Les essais de séparation de la fraction protéique d'un extrait intracellulaire brut révèlent que l'activité caféine déméthylase d'*Aspergillus* V12A25 est dépendante d'un autre cofacteur que le seul NADPH. Ce composé n'a pu être identifié. Il ne peut cependant s'agir de l'oxygène (élément indispensable dans le cas des activités impliquant des cytochromes P-450), car les milieux réactionnels ont toujours été fortement agités avant incubation. D'autre part, sa masse moléculaire semble inférieure à 5 kDa, mais il ne correspond pas à certains cations (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}).

Par contre, l'addition de Fe^{2+} (combiné au NADPH) permet de rétablir partiellement l'activité caféine déméthylase de la fraction protéique, par comparaison à l'activité du système reconstitué (mélange des deux fractions protéique et salée).

Ces résultats sont très originaux car ils font apparaître des différences importantes entre le système impliqué dans la N-déméthylation de la caféine d'*Aspergillus* V12A25 et tous les autres systèmes enzymatiques cités dans la littérature.

On rappellera que dans les microsomes hépatiques de l'homme ou des animaux, la déméthylation de la caféine est le fait d'un système complexe mais bien connu. Celui-ci comprend deux enzymes (un cytochrome P-450 et la NADPH-cytochrome P-450 réductase), un cofacteur réduit (NADPH) et l'oxygène moléculaire. Le cytochrome P-450 (CYP) a une fonction de mono-oxygénation et produit, à partir de caféine, une diméthylxanthine, du formaldéhyde et de l'eau. Dans ce système, le NADPH permet uniquement de régénérer la réductase qui fournit les électrons au CYP. Ce même principe se retrouve dans d'autres systèmes eucaryotes impliquant des réactions de déméthylation liées à des CYP (AOYAMA et coll., 1984 ; KISHIMOTO et coll., 1995).

ASANO et coll. (1994) ont implicitement démontré chez *Pseudomonas putida* No. 352 qu'une enzyme responsable de l'activité caféine déméthylase, partiellement purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium et séparation par chromatographie échangeuse d'anions, reste active en présence de NADH et d'oxygène uniquement. Par ailleurs, ces auteurs ont mesuré la formation de formaldéhyde ainsi que la consommation d'oxygène, au cours de la réaction enzymatique. D'autres auteurs ont démontré chez *Ps. putida* C1 que le formaldéhyde formé par déméthylation de la caféine est rapidement transformé en acide formique par une NAD-formaldéhyde déshydrogénase (HOHNLOSER et coll., 1980).

Dans le cas des essais réalisés sur des fractions protéiques d'*Aspergillus* V12A25, l'inhibition de la réaction de déméthylation n'est pas imputable à un manque d'oxygène. On peut alors supposer que la perte d'activité est liée soit à l'absence d'un composé jouant le rôle d'accepteur du groupement méthyle (rôle tenu par l'O₂ chez *Ps. putida*), soit à une forte inhibition de la décaféinase par le sous-produit de déméthylation qui ne serait plus transformé dans un tel système.

Enfin, les essais de purification des protéines par gel filtration montre que l'activité caféine déméthylase est récupérée essentiellement dans une fraction protéique qui correspondrait à des poids moléculaires de 20 à 45 kDa. Cette plage de poids moléculaires est relativement proche des valeurs données d'une manière générale pour les cytochromes P-450 (50 à 60 kDa). Par contre, elle est assez différente du poids moléculaire de la théobromine déméthylase, purifiée chez *Ps. putida* No. 352, et évalué à 250 kDa (ASANO et coll., 1994).

7.6. CONCLUSION

Nos travaux de recherche ont permis pour la première fois de mettre en évidence et de doser l'activité caféine déméthylase chez un champignon filamenteux. Cette activité est **cytoplasmique** chez *Aspergillus* V12A25, lorsque ce microorganisme est cultivé dans un milieu liquide à base de caféine. L'extrait intracellulaire brut obtenu après un broyage du mycélium suivi d'une ultracentrifugation (200.000 g) présente une faible activité en présence de caféine comme unique substrat. L'addition de NADPH au volume réactionnel accroît fortement cette activité.

La mise au point du dosage de l'activité caféine déméthylase, réalisée sur cet extrait intracellulaire brut, a permis entre autres d'établir les valeurs optimales de température et de pH pour cette réaction, définies respectivement entre 30 et 32°C et entre 7,3 et 7,5. Dans ces conditions, l'activité caféine déméthylase peut atteindre des niveaux comparables en terme d'activité spécifique à ceux définis pour des microsomes hépatiques (environ 650 pmol de caféine déméthylées par min. et par mg de protéines totales). Néanmoins, ces niveaux d'activité sont inférieurs à ceux enregistrés dans des extraits bruts de *Pseudomonas* (14,3 à 33,3 nmol de caféine déméthylées par min. et par mg de protéines totales, selon HOHNLOSER et coll., 1980).

L'activité de l'extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25 est d'une manière générale relativement instable et sensible à divers paramètres physico-chimiques, même en présence de certains protecteurs comme le dithiothréitol ou l'acide ascorbique. Ainsi, l'EDTA et certains cations comme le zinc, le cobalt ou le mercure présentent un fort effet inhibiteur. L'élévation de la force molaire de la solution tampon inhibe rapidement l'activité (seuil critique : 250 mM). Enfin, l'activité caféine déméthylase de l'extrait intracellulaire brut est relativement thermosensible ; seules la congélation et la lyophilisation permettant de maintenir cette activité. Parallèlement, l'extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25 n'est plus actif quand il est issu d'une culture où la caféine a été entièrement consommée.

Les premiers essais de purification des décaféinases ont rapidement montré qu'un cofacteur différent du NADPH est indispensable à la mise en évidence de l'activité déméthylasique. L'identification de ce composé n'a pu être déterminée. Toutefois, l'ion Fe^{2+} semble jouer un rôle important dans la réaction enzymatique.

En conclusion, ces travaux préliminaires soulignent le caractère particulièrement original du mécanisme de *N*-déméthylation de la caféine développé par *Aspergillus* V12A25, par rapport aux mécanismes existant chez certaines bactéries et chez les êtres supérieurs.

METABOLISME DE LA CAFEINE
ET
MECANISME DE REGULATION

8. METABOLISME DE LA CAFEINE ET MECANISME DE REGULATION

8.1. INTRODUCTION

Le schéma du métabolisme de la caféine a été décrit chez les êtres supérieurs comme chez certains microorganismes (paragraphe 2.2.2.). Les premiers composés intermédiaires de la dégradation de la caféine sont principalement formés par *N*-déméthylation, et diffèrent d'une famille d'organismes à une autre. Par contre, la voie catabolique de la xanthine en urée et ammonium est plus largement répandue chez les êtres vivants.

Les mécanismes de régulation du métabolisme de la caféine chez les microorganismes ont rarement été étudiés. A l'inverse, diverses études ont montré que le métabolisme de la caféine chez l'homme peut être affecté par de nombreux facteurs endogènes et exogènes qui agissent à plusieurs niveaux sur les cytochromes P-450 impliqués dans la transformation de cette purine (ARNAUD, 1993).

Nous avons donc cherché à élucider au cours de cette étude, le schéma des voies de dégradation de la caféine propres à *Aspergillus* V12A25 et à *Penicillium* V33A25, afin de les comparer à ceux établis chez d'autres organismes. Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'effet de divers substrats azotés sur la capacité des deux champignons, à dégrader la caféine.

8.2. METABOLISME DE LA CAFEINE PAR *Aspergillus* V12A25 ET *Penicillium* V33A25

Les transformations conduisant de la triméthylxanthine à la xanthine, constituent les étapes clés et originales du métabolisme de la caféine chez *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25. C'est pourquoi, nous n'avons cherché à identifier dans cette étude, que les dérivés méthylés de la xanthine, issus de la dégradation de la caféine. Cette étude nous amènera à proposer un schéma de la dégradation de la caféine pour chacun des deux champignons filamenteux.

8.2.1. Identification des premiers intermédiaires de dégradation de la caféine

8.2.1.1. Identification des intermédiaires dans les surnageants de culture

L'identification des premiers intermédiaires de dégradation de la caféine a été réalisée à partir des surnageants de cultures d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25, correspondant aux essais n°2 et 4 du plan d'expérience final présenté au paragraphe 6.3. Les profils des méthylxanthines retrouvées à plus de 10 mg.l⁻¹ sont regroupés dans la figure 8.1.

Les raisons pour lesquelles ces deux milieux ont été étudiés, sont les suivantes :

- l'essai n°2 correspond aux conditions de culture standards en milieu de base Caféine-Saccharose (paragraphes 3.3.1. et 3.3.3.)
- à l'inverse, l'essai n°4 présente des conditions de culture différentes de l'essai n°2, dont une concentration plus élevée en caféine (3 g.l^{-1}). Par ailleurs, ces conditions ne sont pas favorables à un développement rapide des souches (paragraphe 6.3.2.).

La comparaison de la nature et des courbes d'évolution des méthylxanthines produites au cours de ces essais, permettra de définir si des changements majeurs du métabolisme de la caféine sont induits par des modifications de certaines conditions de culture.

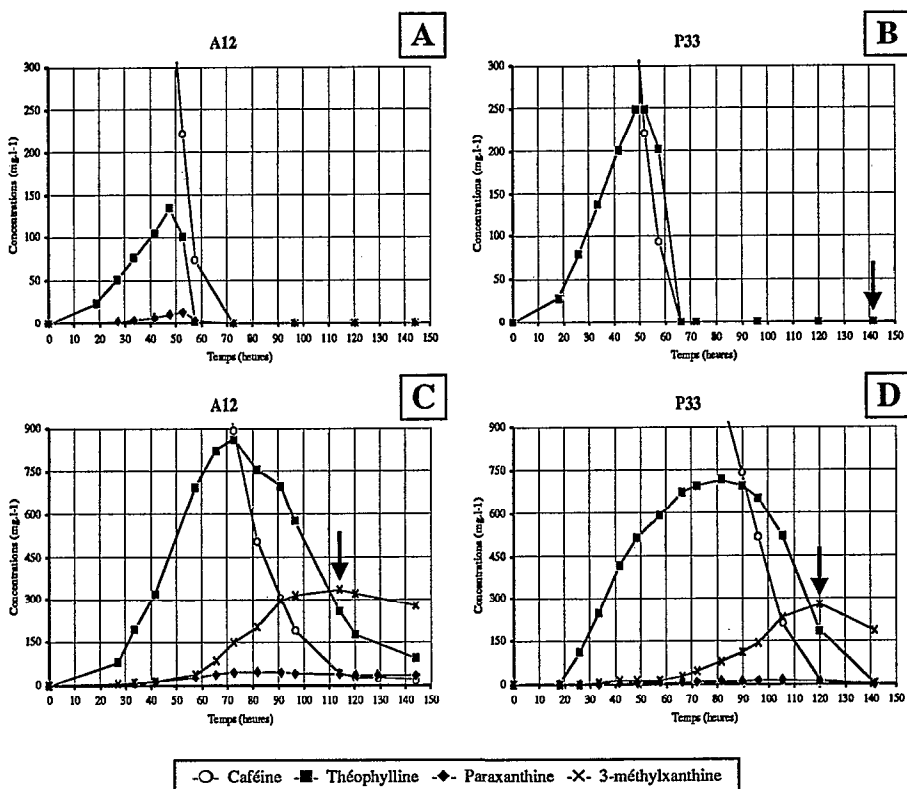


Figure 8.1 : Culture d'*Aspergillus* V12A25 (A et C) et de *Penicillium* V33A25 (B et D) correspondant aux essais n°2 (A et B) et n°4 (C et D) du plan d'expérience final.

Profil des principales méthylxanthines libérées dans les sumageants de culture. Les flèches marquent le moment où la teneur en saccharose est devenue limitante.

A partir des courbes A et B de la figure 8.1, on constate que le principal intermédiaire issu d'une déméthylation de la caféine par *Aspergillus* ou par *Penicillium* cultivés en milieu Caféine-Saccharose "de base", est la théophylline (ou 1,3-diméthylxanthine). Néanmoins, des traces de paraxanthine (1,7-diméthylxanthine), de théobromine (3,7-diméthylxanthine) et de 3-méthylxanthine (3MX) sont également décelées dans les surnageants des cultures. La théophylline s'accumule à concurrence de 140 et de 250 mg.l⁻¹ dans les cultures d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 respectivement. Puis elle est rapidement dégradée lorsque le niveau de caféine diminue. Les mécanismes de déméthylation de la caféine semblent particulièrement actifs entre la 50e et la 60e heure d'incubation. Finalement, chaque intermédiaire détecté disparaît plus ou moins en même temps que la caféine, après 60 à 70 heures d'incubation. Tous ces résultats sont en accord avec ceux obtenus antérieurement (DENIS, 1992).

La modification des conditions de culture des microorganismes n'entraîne pas un changement de la nature du principal métabolite produit, correspondant à la théophylline (Figure 8.1-C et D). Par contre, l'utilisation d'un milieu riche en caféine et peu favorable à une élimination rapide de la caféine par les champignons, permet de mieux visualiser les autres intermédiaires de dégradation, car l'accumulation de ces derniers dans le surnageant est plus importante. C'est notamment le cas pour la paraxanthine et surtout pour la 3MX. Par ailleurs, des traces de 1-méthylxanthine (1MX) et de 7-méthylxanthine (7MX), sont détectées essentiellement dans le surnageant de la culture d'*Aspergillus* ; ainsi que la présence d'un produit de dégradation non identifié (avec un temps de rétention compris entre celui de la 1MX et celui de la théobromine).

D'autre part, on observe essentiellement dans les cultures n°4 (Figure 8.1-C et D), un décalage successif entre les profils de dégradation de la caféine, de la théophylline et de la 3MX. D'une manière générale, un intermédiaire s'accumule dans le surnageant de culture jusqu'à ce que sa concentration devienne plus ou moins majoritaire par rapport aux autres composés. Pendant cette période, ce métabolite est globalement plus rapidement synthétisé qu'il n'est dégradé. Ce phénomène s'inverse lorsque ce composé devient majoritaire. Dans ces conditions, on peut conclure que la nature du métabolite majoritaire témoigne du mécanisme réactionnel préférentiellement mis en œuvre par le microorganisme.

Dans tous les cas de figure, le niveau global des diméthylxanthines n'atteint jamais la teneur initiale de la caféine. Le même phénomène est observable entre les di- et les monométhylxanthines, confirmant ainsi que toutes les réactions de *N*-déméthylation de la caféine sont réalisées simultanément par *Aspergillus* V12A25 et par *Penicillium* V33A25.

8.2.1.2. Identification des intermédiaires à partir des essais enzymatiques

Nous avons cherché à comparer la nature et les proportions des produits de la réaction de déméthylation de la caféine par *Aspergillus* V12A25, obtenus *in vitro* et *in vivo*.

Dans ce but, un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* a été utilisé pour la réalisation d'un essai enzymatique standard où la caféine a été utilisée comme substrat (paragraphe 3.7.). Les produits de la réaction ont été extraits des volumes réactionnels et identifiés par CLHP selon la méthode décrite au paragraphe 3.6.1.2. (Figure 8.2).

Les principales méthylxanthines issues de l'activité déméthylasique d'un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25, sont la théophylline et la 3-méthylxanthine (Figure 8.2). Deux autres méthylxanthines sont également décelée à l'état de traces. Il s'agit de la théobromine et de la paraxanthine.

Ce test *in vitro* confirme donc les résultats obtenus au cours des cultures cellulaires de la souche *Aspergillus* V12A25. On soulignera notamment que les proportions entre les différentes méthylxanthines analysées dans les deux études sont similaires.

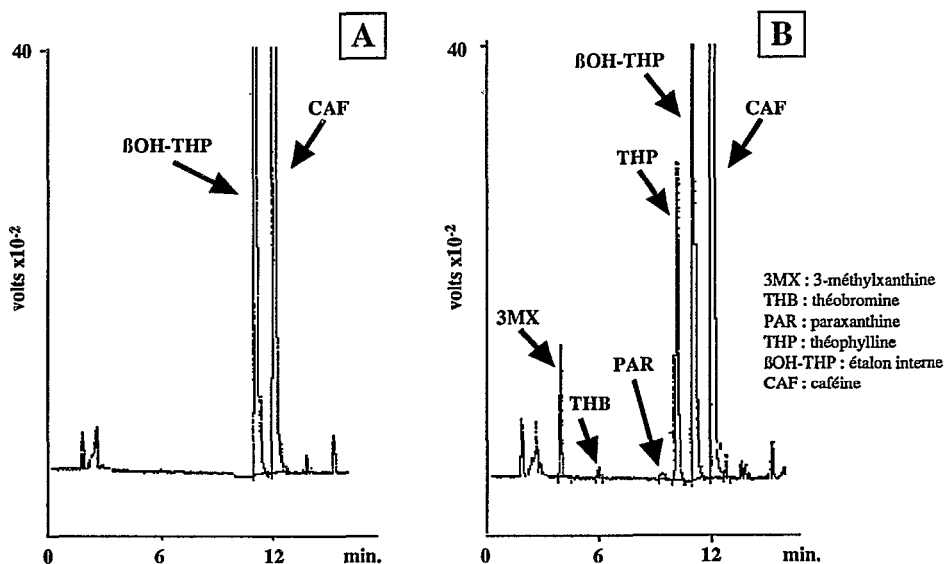


Figure 8.2 : Profil chromatographique en CLHP des méthylxanthines issues de la dégradation *in vitro* de la caféine par un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25. Essai témoin sans réaction (A), essai après réaction (B).

8.2.2. Dégradation *in vitro* des méthylxanthines par *Aspergillus* V12A25

Nous avons enfin voulu déterminer le pouvoir de déméthylation d'un extrait intracellulaire d'*Aspergillus* V12A25 sur toutes les méthylxanthines dérivées de la caféine, afin de confirmer la voie préférentielle de dégradation de la triméthylxanthine empruntée par cette souche.

Pour cela, des essais enzymatiques ont été réalisés sur un extrait intracellulaire brut obtenu dans les conditions standards (paragraphe 3.7.1.). La concentration des substrats a été diminuée par rapport aux conditions standards en raison des limites de solubilité de certaines méthylxanthines. Les conditions opératoires ont donc été les suivantes : VR 1 ml ; protéines 1,33 mg ; méthylxanthine 0,2 mM ; NADPH 0,2 mM ; MgCl₂ 1 mM ; tampon phosphate 50 mM, pH 7,6 ; réaction 30°C - 1 h. Les résultats des analyses quantitatives et qualitatives réalisées pour chaque méthylxanthine testée sont regroupés dans le tableau 8.1.

Les résultats de ces essais *in vitro* démontrent que toutes les méthylxanthines sont dégradables par un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25, obtenu à partir d'une culture en milieu Caféine-Saccharose (Tableau 8.1). Ceci confirme les résultats obtenus *in vivo* où toutes les méthylxanthines apparaissant dans le surnageant de culture de cette souche, même en faibles quantités, sont entièrement dégradées ; tant que les conditions de culture restent non limitantes.

L'activité caféine déméthylase de l'extrait intracellulaire brut est relativement faible comparée à plusieurs autres activités déméthylasiques, mais ce résultat est à relativiser. En effet, dans le cas de la caféine, on peut supposer que deux réactions au minimum ont lieu dans le volume réactionnel, l'une menant à la production de théophylline et l'autre à celle de 3-méthylxanthine. Il s'en suivrait une compétition pour les cofacteurs (notamment pour le cofacteur "inconnu" - voir chapitre 7) et donc une diminution de l'activité apparente pour la caféine. En tout état de cause, il semble préférable de comparer les activités pour des dérivés possédant le même nombre de groupements méthyles.

Parmi les trois diméthylxanthines, l'extrait intracellulaire brut présente une plus grande activité pour la théophylline, suivie par la théobromine. L'activité vis-à-vis de la paraxanthine est plus faible ce qui démontre que cette méthylxanthine n'est pas un substrat naturel des enzymes impliquées dans la déméthylation de la caféine chez *Aspergillus* V12A25. Par ailleurs, l'identification des principales monométhylxanthines formées lors de ces réactions renforce l'idée d'un mécanisme préférentiel de déméthylation de la caféine ; la N7-déméthylation étant réalisée en premier et la N3-déméthylation en dernier.

Enfin, les faibles activités 7MX déméthylase et 1,7-diméthylxanthine déméthylase obtenues démontrent que les déméthylases produites par *Aspergillus* V12A25 reconnaissent difficilement les dérivés ne possédant pas de groupement méthyle en position N3.

Tableau 8.1 : Spécificité de substrat d'un extrait intracellulaire brut d'*Aspergillus* V12A25. Activité déméthylasique (A.D.) et principaux produits formés pour chaque méthylxanthine testée (écart-type sur trois répétitions).

Substrats	A. D. ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	A. D. (% de la caféine)	Principaux produits formés
Caféine (1,3,7-dMX)	546 ($\pm$ 65)	100	Théophylline + 3MX
Théophylline (1,3-dMX)	857 ($\pm$ 46)	157	3MX
Théobromine (3,7-dMX)	680 ($\pm$ 31)	125	3MX
Paraxanthine (1,7-dMX)	310 ($\pm$ 21)	57	1MX
1-méthylxanthine (1MX)	1098 ($\pm$ 66)	201	n.i.*
3-méthylxanthine (3MX)	767 ($\pm$ 24)	140	n.i.
7-méthylxanthine (7MX)	127 ($\pm$ 44)	23	n.i.

* n.i. : non identifié

8.2.3. Voie métabolique de la caféine

L'étude des méthylxanthines retrouvées dans des surnageants de culture (paragraphe 8.2.1.1.), montrent que les premiers intermédiaires de la dégradation de la caféine sont identiques chez *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25. Il s'agit principalement de la théophylline et de la 3-méthylxanthine. La formation de ces deux principaux intermédiaires ainsi que de certains métabolites minoritaires, a été confirmée chez *Aspergillus* V12A25 par l'analyse qualitative en CLHP des produits d'une réaction enzymatique réalisée sur un extrait intracellulaire brut, avec de la caféine comme substrat (paragraphe 8.2.1.2.).

L'ensemble des résultats de ces deux études prouve que les groupements méthyles de la caféine sont éliminés successivement. Par ailleurs, toutes les étapes de transformation de la caféine sont réalisées simultanément, permettant ainsi le développement des champignons.

Les faibles quantités de théobromine, paraxanthine, 1MX et 7MX, issues de la dégradation *in vivo* (paragraphe 8.2.1.1.) ou *in vitro* (paragraphe 8.2.1.2.) de la caféine, combinées aux résultats des tests enzymatiques réalisés sur différentes méthylxanthines (paragraphe 8.2.2.) démontrent une certaine spécificité des mécanismes de déméthylation de la caféine chez *Aspergillus* V12A25.

Le champignon procéderait préférentiellement à une N7-déméthylation de la caféine conduisant à la formation de théophylline ; suivie d'une N1-déméthylation conduisant à la formation de 3MX. Bien que nous n'ayons pas pu mettre en évidence la xanthine par analyse chromatographique, il est fort probable que la 3MX soit dégradée par élimination de son groupement méthyle. Aux vues des résultats obtenus *in vivo* pour *Penicillium* V33A25 (paragraphe 8.2.1.1.), il est probable que le même mécanisme soit applicable à cette souche.

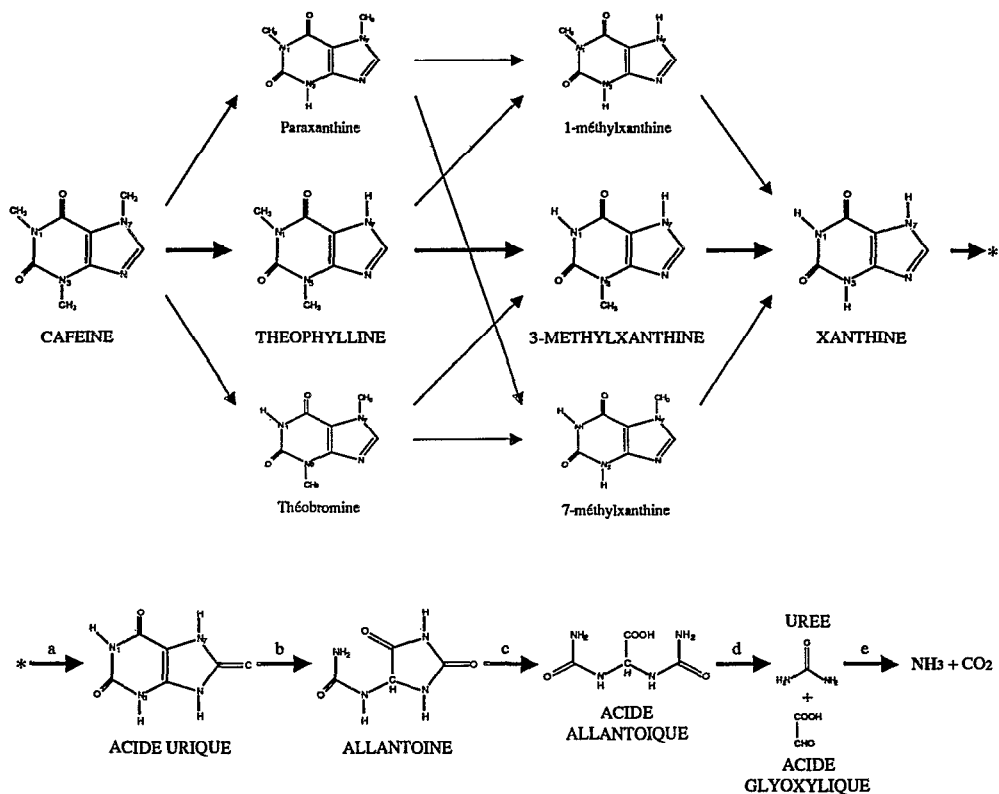
Nos résultats sont en accord avec ceux de SCHWIMMER et coll. (1971) et ceux de INA (1971). Ces auteurs ont respectivement démontré qu'une souche de *Penicillium roquefortii* dégradait la caféine en théophylline, et qu'une souche d'*Aspergillus niger* dégradait la caféine en théophylline, 3-méthylxanthine et xanthine. L'utilisation d'une technique en CLHP nous a cependant permis d'affiner l'analyse des dérivés méthylés produits, en identifiant plusieurs autres intermédiaires. Il semble donc que les champignons filamenteux appartenant aux genres *Penicillium* et *Aspergillus*, et isolés pour leur capacité à dégrader la caféine, réalisent essentiellement cette opération *via* la théophylline et la 3-méthylxanthine.

Comme cela a été souligné dans l'analyse bibliographique, cette voie catabolique diffère de celles développées par d'autres organismes. Ainsi, on rappellera que chez les bactéries aptes à dégrader la caféine, les principaux intermédiaires métaboliques sont la théobromine et la 7MX (GLÜCK et LINGENS, 1987). Le catabolisme de la caféine chez l'homme est plus complexe, mais les réactions de déméthylation de la triméthylxanthine conduisent principalement à la formation de paraxanthine et de 1MX (BERTHOU et coll., 1989). Enfin, le catabolisme de la caféine est réalisé dans le caféier, *via* la théobromine et la théophylline, elles-mêmes déméthylées en 3MX et 7MX (MAZZAFERA et coll., 1994a).

Par ailleurs, les voies de dégradation des purines (dont la xanthine) jusqu'au stade de l'ammonium ont été élucidées chez *Aspergillus nidulans* (SCAZZOCCHIO et DARLINGTON, 1968) et chez *Penicillium chrysogenum* (ALLAM et ELZAINY, 1969). Les principaux intermédiaires azotés sont : la xanthine, l'acide urique, l'allantoïne, l'acide allantoïque, l'urée et l'ammonium. Ces mêmes métabolites (l'ammonium excepté) ont été mis en évidence chez une souche de *Ps. putida* apte à dégrader la caféine (BLECHER et LINGENS, 1977).

En fait, cette voie catabolique des purines est commune à un grand nombre d'organismes vivants, le métabolite final étant fonction de la capacité de l'organisme à l'assimiler (LEHNINGER et coll., 1994).

L'ensemble de ces résultats et de ces observations nous permettent donc de proposer un schéma de la voie de dégradation de la caféine en ammonium, mise en œuvre par *Aspergillus* V12A25 comme par *Penicillium* V33A25 au cours de leur culture en milieu synthétique liquide, à base de caféine comme unique source d'azote. Ce schéma est présenté dans la figure 8.3.



Légende : a : xanthine déshydrogénase, b : uricase (urate oxydase), c : allantoïnase, d : allantoïcasse, e : uréase.
 ➔ voie majoritaire, ➞ voie minoritaire.

Figure 8.3 : Voie de dégradation de la caféine chez *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25.
 Dégradation de la xanthine en ammonium d'après SCAZZOCCHIO et DARLINGTON (1968) ; ALLAM et ELZAINY (1969).

8.3. REGULATION DE LA DEGRADATION DE LA CAFEINE

Les conditions d'étude utilisées jusqu'alors (milieux synthétiques pauvres), nous ont permis d'écarter tout problème d'inhibition et de compétition au niveau du métabolisme de la caféine, qu'aurait inévitablement entraîné la culture des champignons sur un milieu complexe et riche. En utilisant la caféine comme seule source d'azote disponible pour leur croissance, nous avons donc toujours orienté le métabolisme des deux souches vers la dégradation complète de la purine.

Ce principe de base a largement été adopté pour l'étude du métabolisme de la caféine chez des microorganismes aptes à la dégrader. Néanmoins, quelques auteurs ont montré que la dégradation de la caféine n'est pas inhibée lorsque le milieu de culture contient d'autres sources d'azote organique comme de l'extrait de levure (TSUBOUCHI et coll., 1985 ; GLÜCK et LINGENS, 1987 ; ASANO et coll., 1993). D'autre part, PERRAUD-GAIME (1995) a montré que les souches *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25 dégradent la caféine contenue dans la pulpe de café, substrat par ailleurs riche en matières azotées (paragraphe 2.3.3.2.).

La présente étude aura pour objectif de déterminer si l'addition d'une source simple d'azote dans un milieu de culture contenant de la caféine, peut perturber la dégradation de celle-ci. Puis, à l'aide de tests enzymatiques, nous établirons si la dégradation de la caféine revêt un caractère constitutif, ou bien inductible chez *Aspergillus* V12A25.

8.3.1. Effet *in vivo* de la présence d'une source simple d'azote

Une série d'expériences a été réalisée afin de connaître quelles conséquences pouvait entraîner l'addition d'une source simple d'azote au milieu de culture Caféine-Saccharose, sur la capacité des deux souches à dégrader la caféine. Le sulfate d'ammonium et l'urée ont été choisis comme complément azoté : le premier, pour son rôle de régulateur du métabolisme de l'azote reconnu chez les champignons (PATEMAN et coll., 1973 ; SMITH et BERRY, 1976) ; et le second, parce qu'il correspond très vraisemblablement au dernier intermédiaire de la voie de dégradation de la caféine, avant l'ammonium (paragraphe 8.2.3.).

8.3.1.1. Conditions opératoires

Le milieu témoin a été le milieu de base Caféine-Saccharose. Des volumes croissants de solutions concentrées et filtrées de sulfate d'ammonium ou d'urée ont été ajoutés à ce milieu après autoclavage, de manière à satisfaire des quantités en atomes d'azote équivalentes à 10, 50 et 100 % de celles initialement présentes sous forme de caféine. Les conditions standards d'inoculation et de culture ont été appliquées pour cette étude (paragraphe 3.3.).

Les milieux utilisés pour cette étude sont les suivants :

		Relation Carbone (sacc.) / Azote (caf.)
CS	Milieu témoin (caféine : 1 g.l ⁻¹)	50
CS+10A	Milieu CS contenant 0,136 g.l ⁻¹ de sulfate d'ammonium	45,5
CS+50A	Milieu CS contenant 0,680 g.l ⁻¹ de sulfate d'ammonium	33,3
CS+100A	Milieu CS contenant 1,360 g.l ⁻¹ de sulfate d'ammonium	25
CS+10U	Milieu CS contenant 0,062 g.l ⁻¹ d'urée	45,5
CS+50U	Milieu CS contenant 0,310 g.l ⁻¹ d'urée	33,3
CS+100U	Milieu CS contenant 0,620 g.l ⁻¹ d'urée	25

8.3.1.2. Evolution de l'urée et du sulfate d'ammonium

La figure 8.4 regroupe les cinétiques de consommation du sulfate d'ammonium et de l'urée pour chacune des souches cultivées sur les six milieux supplémentés en azote. Les résultats sont exprimés en équivalent ammonium.

Les profils de consommation du sulfate d'ammonium et de l'urée sont comparables chez les deux souches. Après une phase de latence de 8 à 12 heures, *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25 consomment totalement ces deux composés. Cependant, à teneurs équivalentes en azote, le sulfate d'ammonium est assimilé par les deux champignons de 1,5 à 2 fois plus rapidement que l'urée ; et les vitesses maximales de consommation du sulfate d'ammonium sont 4 fois supérieures à celles de l'urée (Figure 8.4).

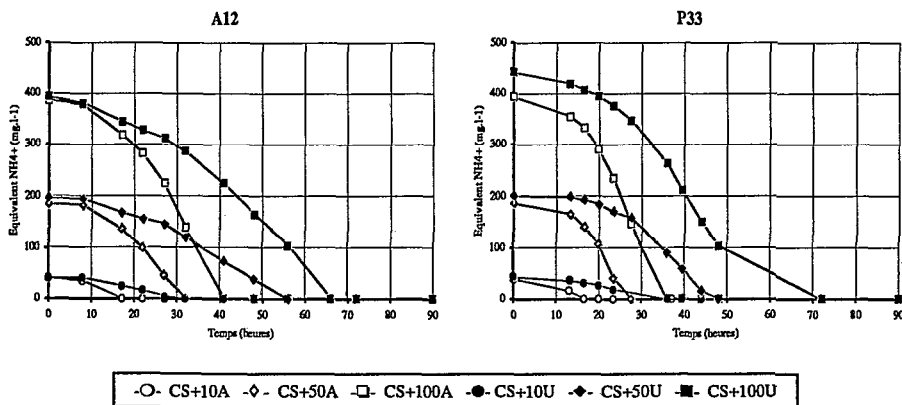


Figure 8.4 : Cultures d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 en milieu CS supplémentés en sulfate d'ammonium ou en urée, à différentes concentrations. Evolutions du sulfate d'ammonium et de l'urée (exprimées en équivalent NH₄⁺).

Ce résultat est peu surprenant puisque le sel d'ammonium constitue une source azotée directement assimilable par les champignons filamenteux, contrairement à l'urée qui doit préalablement subir l'action d'une uréase.

8.3.1.3. Evolution de la caféine

Nous avons représenté sur la figure 8.5 les cinétiques de dégradation de la caféine obtenues pour chacun des sept milieux de culture et pour chaque souche. A partir de ces cinétiques, les vitesses maximales de dégradation de la caféine et les temps estimés pour atteindre plus de 99 % de dégradation de la caféine ont été calculés (Tableau 8.2).

- Dans les milieux avec ou sans supplément d'urée

A partir des courbes des figures 8.5-C et 8.5-D, on constate globalement que l'addition d'urée dans les milieux de culture (de 0,062 à 0,62 g.l⁻¹) n'a que peu d'influence sur les cinétiques de dégradation de la caféine par *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25. Cette dégradation est toutefois initialisée plus rapidement dans les milieux avec urée, permettant ainsi de diminuer le temps de disparition de la purine d'environ 8 heures par rapport au témoin, dans le cas de *Penicillium* (Figure 8.5-D et Tableau 8.2). Ce phénomène est probablement lié au fait que la germination des conidies et la production de biomasse sont plus rapides dans les milieux CS+Urée que dans le milieu CS (paragraphe 8.3.1.5.).

- Dans les milieux avec ou sans supplément de sulfate d'ammonium

L'ajout de sulfate d'ammonium au milieu de culture s'est avéré *a contrario* très influant chez les deux souches. Dans un premier temps, on observe que le début de la dégradation de la caféine est d'autant plus retardé que la quantité d'ammonium est élevée dans le milieu de culture (Figures 8.5-A et 8.5-B). Néanmoins, dans un deuxième temps, la caféine est complètement éliminée du milieu de culture. Le sulfate d'ammonium inhibe donc de manière temporaire la dégradation de la caféine par *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25.

Pour *Aspergillus* V12A25, comparé au témoin, cet effet inhibiteur ne se fait réellement ressentir que pour des teneurs en sulfate d'ammonium supérieures à 0,136 g.l⁻¹ (Figure 8.5-A). Il se traduit uniquement par une prolongation du temps nécessaire à une complète dégradation de la purine ; les vitesses maximales restant inchangées par rapport à celle du témoin (Tableau 8.2).

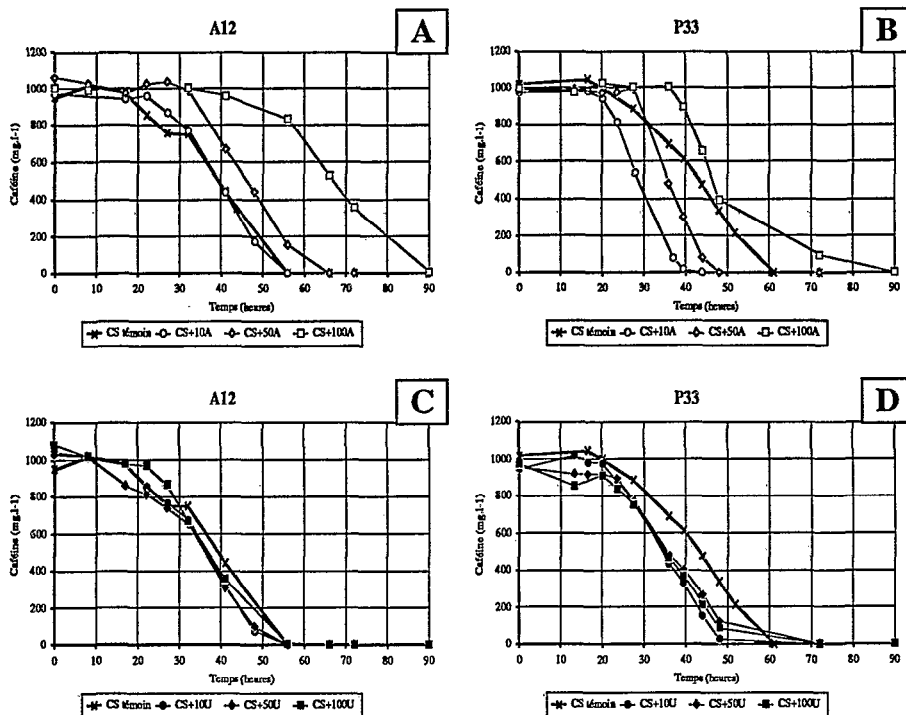


Figure 8.5 : Cultures d'*Aspergillus* V12A25 (A et C) et de *Penicillium* V33A25 (B et D) en milieux CS supplémentés ou non en sulfate d'ammonium (A et B) ou en urée (C et D). Evolution de la caféine.

Tableau 8.2 : Cultures d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 en milieux CS, supplémentés ou non en sulfate d'ammonium ou en urée, à différentes concentrations. Vitesses maximales de dégradation de la caféine et temps estimés pour atteindre 99 % de dégradation de la caféine.

Milieux de culture	V max caf (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)		t 99 % (h)	
	A12	P33	A12	P33
CS	31	34	53	58
CS+10A	33	54	53	40
CS+50A	34	58	60	47
CS+100A	30	58	90	80
CS+10U	33	35	50	49
CS+50U	35	33	52	52
CS+100U	35	33	56	50

Pour *Penicillium* V33A25, le début de la dégradation de la caféine est également retardé par rapport au témoin dans les milieux CS+50A et CS+100A essentiellement (Figure 8.5-B). Mais l'apport d'ammonium de 0,136 à 1,36 g.l⁻¹ permet par la suite d'accroître la capacité du champignon à dégrader la caféine, en augmentant les vitesses maximales de dégradation d'un facteur 1,65 environ par rapport au témoin (Tableau 8.2). Dans le cas des milieux CS+10A et CS+50A, le temps nécessaire à une dégradation complète de la caféine par *Penicillium* V33A25, est alors fortement réduit par rapport à celui du témoin (de 18 et 11 heures respectivement). Par contre, pour la culture en CS+100A, à une phase rapide de dégradation de la caféine, succède un ralentissement de la dégradation, corrélée à un appauvrissement en source carbonée (Tableau 8.3, paragraphe 8.3.1.5.). Ceci provoque donc une augmentation du temps nécessaire à une dégradation complète de la caféine.

Il est peu probable que la stimulation de la dégradation de la caféine chez *Penicillium* V33A25 soit due à une activation strictement biochimique de la dégradation de la caféine. Par contre, la modification du mode de développement du champignon (exposée dans le paragraphe 8.3.1.5.), et sa croissance plus rapide dans les milieux supplémentés en ammonium (Tableau 8.3, paragraphe 8.3.1.5.) seraient à l'origine de ce phénomène.

8.3.1.4. Comparaison des cinétiques d'utilisation des sources d'azote

Afin de mieux visualiser l'influence de chaque source simple d'azote sur la dégradation de la caféine, nous avons représenté pour chaque milieu de culture, les cinétiques de consommation de la source simple d'azote et de la purine ; ainsi que l'évolution du pH. La figure 8.6 reprend uniquement les cinétiques obtenues sur milieux CS témoin, CS+50A et CS+50U. Pour les deux souches, des résultats identiques sont obtenus en comparant les profils de disparition de la caféine et de la source d'azote des milieux CS+10A/U, comme des milieux CS+100A/U (cf. annexe 4).

- Evolution des sources d'azote

La comparaison des cinétiques de dégradation de la caféine d'une part et de la source simple d'azote d'autre part (Figure 8.6), nous permet de conclure, pour les deux souches, que :

- l'addition d'urée n'a pas d'effet inhibiteur sur la dégradation de la caféine. Les deux composés azotés sont dégradés simultanément.
- l'addition d'ammonium provoque une inhibition totale de la dégradation de la caféine. Cette inhibition est levée après complète assimilation du sulfate d'ammonium.

La dégradation de la caféine par *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25 est donc soumise à une régulation par les ions ammonium. La nature de cette régulation sera précisée au cours d'une étude plus spécifique (paragraphe 8.3.2.2.).

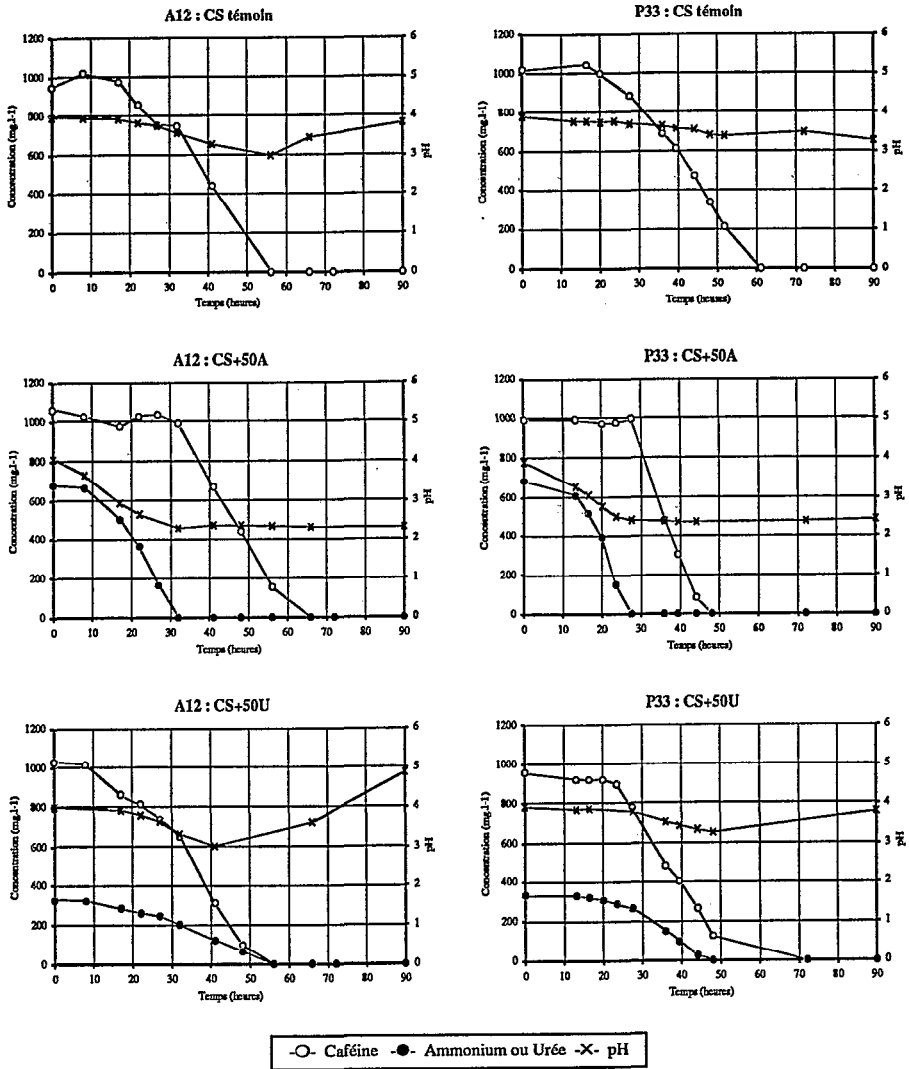


Figure 8.6 : Cultures d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 en milieux CS, supplémentés ou non en sulfate d'ammonium à 0,68 g.l⁻¹, ou en urée à 0,31 g.l⁻¹. Evolution du pH et comparaison des cinétiques de consommation de la caféine et de la source simple d'azote.

- Evolution du pH

L'évolution du pH du milieu de culture apparaît également comme une caractéristique significative dans ces essais.

Dans toutes les cultures d'*Aspergillus* ou de *Penicillium* en milieux CS+Ammonium, on observe une baisse du pH corrélée à la consommation de l'ammonium (Figure 8.6), qui est d'autant plus importante que la teneur initiale en sulfate d'ammonium est élevée. Ainsi, le pH du milieu atteint des valeurs de 2,35 pour les cultures en CS+50A, et de 2,05 en moyenne pour les cultures en CS+100A. Lorsque l'ammonium a totalement disparu du milieu, le pH se stabilise et reste constant jusqu'à la fin de la culture. Il est intéressant de souligner que les deux microorganismes se développent et dégradent toujours la caféine même à des valeurs de pH très faibles.

La baisse du pH corrélée à la consommation d'ammonium est un phénomène bien connu chez les champignons filamenteux. L'assimilation des ions ammonium entraîne la libération de protons H^+ et donc une acidification du milieu extracellulaire (SMITH et BERRY, 1976 ; ONIONS et coll., 1981).

Dans les milieux CS+Urée, l'évolution du pH est similaire à celle du milieu témoin. Une légère acidification de 1 unité pH environ dans les cultures d'*Aspergillus* V12A25, et de 0,7 unité pH environ dans celles de *Penicillium* V33A25, est corrélée à la dégradation de la caféine. Par la suite, le pH augmente d'autant plus que la quantité d'urée présente initialement est importante. Cette alcalinisation des milieux de culture est cependant plus marquée chez *Aspergillus* V12A25 que chez *Penicillium* V33A25. Elle pourrait correspondre à un début de lyse des cellules.

Ces observations soulignent encore la modification du comportement des champignons filamenteux (donc de leur métabolisme général) que provoque l'addition du sulfate d'ammonium dans le milieu de culture Caféine-Saccharose.

8.3.1.5. Effets sur la biomasse mycélienne

L'addition d'une source simple d'azote au milieu de base Caféine-Saccharose, entraîne des modifications notables du comportement des champignons filamenteux. Ces modifications touchent particulièrement tous les stades de développement des souches.

- Structures somatiques pour Penicillium et Aspergillus

- Chez *Penicillium* V33A25, la présence du sulfate d'ammonium comme celle d'urée permet d'accélérer la germination, et d'augmenter le pourcentage de germination des conidies.

En présence d'urée, les pelotes mycéliennes apparaissent plus vite dans les milieux de culture que dans le milieu témoin. Le mycélium se ramifie et se développe également plus rapidement. Par la suite, le développement des pelotes ainsi que l'aspect du mycélium deviennent comparables à ceux du témoin (grosses pelotes très denses en fin de culture).

Par contre, en présence de sulfate d'ammonium plusieurs modifications morphologiques sont observées. Le mycélium forme une sorte de réseau lâche plus ou moins dense, et les quelques pelotes mycéliennes formées restent de taille variable et peu denses (Figure 8.7-A). Ce phénomène est probablement à l'origine de l'augmentation des vitesses de dégradation de la caféine enregistrée pour ces milieux ; la dispersion du mycélium permettant d'augmenter la surface globale d'échange entre le milieu et la masse mycélienne (paragraphe 8.3.1.3.).

Par ailleurs, lorsque la teneur en sulfate d'ammonium est faible (CS+10A), la morphologie du mycélium reste normale et comparable à celle observée dans le milieu témoin. Par contre, dans les milieux à fortes concentrations en ammonium (CS+50A et CS+100A), le diamètre du mycélium devient irrégulier : large et trapu près de la conidie mère, il présente des zones de renflements ("noeuds") sur toute sa longueur et des extrémités plus étroites (Figure 8.7-B).

- Chez *Aspergillus* V12A25, la germination des conidies est également accélérée en présence de sulfate d'ammonium ou d'urée. Dans tous les cas, les conidies se regroupent et forment par la suite des pelotes mycéliennes.

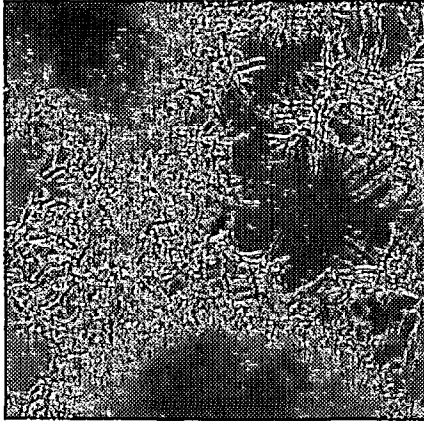
En présence d'urée, le diamètre des pelotes augmente plus rapidement, mais leur aspect général reste identique à celui des pelotes du milieu témoin.

Comme dans le cas de *Penicillium*, plus les milieux de culture sont supplémentés en sulfate d'ammonium, plus le mycélium d'*Aspergillus* se transforme morphologiquement. Il devient très cloisonné et trapu, rendant ainsi les pelotes très denses (Figure 8.7-C et D).

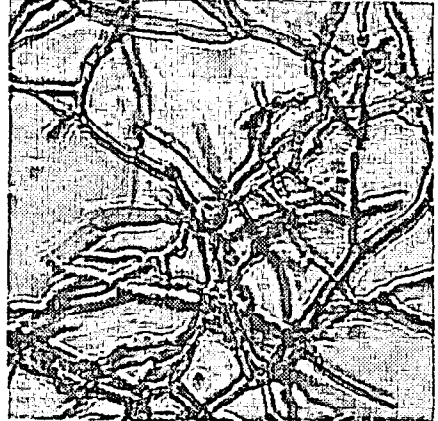
- Structures reproductrices pour *Penicillium* et *Aspergillus*

- Pour *Penicillium* V33A25, aucune conidiogenèse n'est apparue dans tous les milieux de culture. Par contre, après 44 heures de culture dans les milieux CS+Urée et seulement après 66 heures dans les autres milieux, des morceaux assez longs de mycélium sont visibles dans le surnageant de culture, certainement détachés des pelotes mycéliennes.

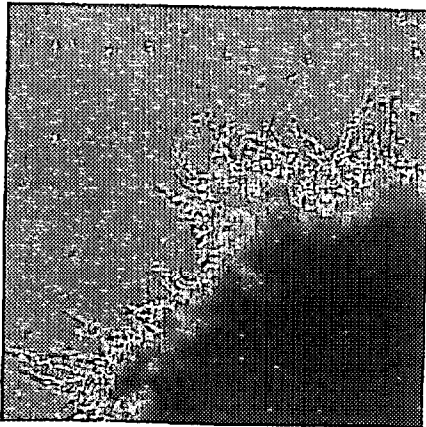
- Pour *Aspergillus* V12A25, aucune conidiogénèse n'est apparue dans les milieux contenant initialement beaucoup de sulfate d'ammonium (CS+50A et CS+100A). Seuls de nombreux petits fragments de mycélium sont visibles après 48 heures d'incubation. SMITH et BERRY (1975) avaient déjà rapporté que les sels d'ammonium avaient un effet inhibiteur sur la conidiogénèse des champignons cultivés en milieu submergé. Dans tous les autres milieux (CS et CS+Urée), une conidiogénèse est observable après 40 heures d'incubation.



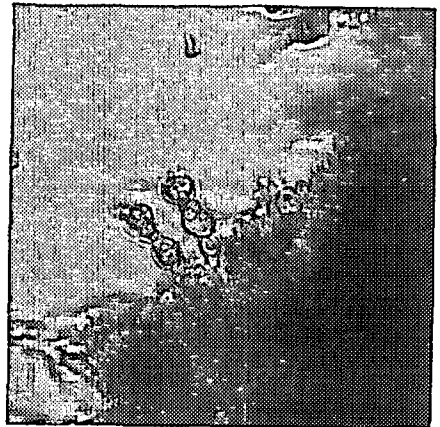
A. P33 CS+100A (x100)



B. P33 CS+100A (x400)



C. A12 CS+100A (x100)



D. A12 CS+100A (x400)

Figure 8.7 : Vues au microscope optique d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 cultivés en milieux CS+100A après 2 à 3 jours d'incubation.

En conclusion, la présence d'urée ne modifie que partiellement la morphologie générale des deux souches. En revanche, l'addition de sulfate d'ammonium à plus de 0,136 g.l⁻¹ dans le milieu de culture, provoque de profondes transformations *a priori* permanentes puisqu'elles sont toujours observables après la complète consommation de ce substrat. Il se pourrait que ces modifications morphologiques soient liées à la forte acidification du milieu de culture, en présence de sulfate d'ammonium. Il n'est cependant pas possible de savoir si ces changements sont directement impliqués dans l'inhibition de la dégradation de la caféine, en provoquant par exemple des modifications des systèmes de transport ou de reconnaissance de la molécule au niveau des parois cellulaires des champignons.

- Biomasse finale et consommation du saccharose

Les quantités de biomasse et de sucres résiduels mesurées à 72 et 90 heures de culture sont regroupées dans le tableau 8.3. Ces résultats montrent que la source de carbone n'a pas été un facteur limitant de la croissance des champignons puisqu'elle n'a été épuisée qu'après la disparition des sources d'azote, excepté pour la culture de *Penicillium* V33A25 sur CS+100A. Ceci expliquerait le ralentissement de la dégradation de la caféine observé pour cet essai en fin de culture (Figure 8.5-B, paragraphe 8.3.1.3.).

L'addition d'urée ou d'ammonium en fortes proportions, permet d'atteindre plus rapidement les maxima de production de biomasse, dès 72 heures de culture (Tableau 8.3). Ceci est dû à la diminution du temps de germination des conidies d'*Aspergillus* comme de *Penicillium*, quelque soit la source simple d'azote ajoutée au milieu de base. Cette diminution du temps de germination est une conséquence directe de la mise à disposition de quantités importantes d'azote facilement assimilable par les champignons filamenteux.

Tableau 8.3 : Cultures d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 en milieux CS, supplémentés ou non en sulfate d'ammonium ou en urée, à différentes concentrations. Biomasses et sucres résiduels après 72 et 90 h. d'incubation (Saccharose initial : 29,4 g.l⁻¹).

Milieux de culture	Biomasse (g.l ⁻¹)				Sucres résiduels (g.l ⁻¹)			
	A12		P33		A12		P33	
	72 h	90 h	72 h	90 h	72 h	90 h	72 h	90 h
CS	6,2	8,9	5,9	9,4	nd *	9,4	nd	6,6
CS+10A	5,2	8	10,8	9,1	nd	8,4	3,6	0,2
CS+50A	7,8	8,3	10,7	10,9	nd	5,3	3,8	0,5
CS+100A	10,7	10,9	11,4	11,5	10,6	0,9	5,3	0,9
CS+10U	6,2	7,6	7,7	8,5	nd	7,3	nd	2,3
CS+50U	8,3	7,5	8,6	9,0	nd	1,6	3,8	0,3
CS+100U	8,9	9,3	8,8	8,8	2,1	0,1	0,3	0,3

* nd : non déterminé

Enfin, on notera que la consommation du saccharose par les deux souches est d'autant plus importante que la quantité ajoutée en source simple d'azote augmente. Cependant, cette surconsommation de saccharose ne se traduit pas forcément par une augmentation de la biomasse produite. Ainsi, dans le cas de l'ajout d'urée, les quantités de biomasse produites restent similaires voire inférieures à celles obtenues dans les cultures témoins. Il s'ensuit une diminution des rendements en biomasse par rapport aux témoins, plus importante dans les milieux CS+Urée que dans les milieux CS+Ammonium. Il est possible que nous soyons en présence d'un phénomène de découplage énergétique, dû au rapport C/N élevé. Cependant, l'objectif de ce travail étant axé sur l'étude du métabolisme azoté, nous n'avons pas cherché à préciser plus en avant ce phénomène.

8.3.1.6. Rôle de l'ammonium sur la dégradation de la caféine

Lors de la présente étude, nous avons démontré que la dégradation de la caféine par *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25, est soumise à un phénomène de régulation par l'ammonium ; alors que l'urée ne présente pas d'effet régulateur. L'addition de sulfate d'ammonium dès 0,136 g.l⁻¹ (soit $\approx$ 2 mM d'ions ammonium) au milieu de culture Caféine-Saccharose, serait *a priori* suffisante pour inhiber la dégradation de la caféine par *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25. Le phénomène est néanmoins plus visible à des concentrations de 10,3 et 20,6 mM d'ammonium. Cette inhibition n'est levée qu'après assimilation complète de l'ammonium par les champignons (Figure 8.6, paragraphe 8.3.1.4.).

PATEMAN et coll. (1973) ont étudié chez *Aspergillus nidulans* l'effet de l'addition d'urée ou d'ammonium à 10 mM dans des milieux contenant d'autres sources d'azote plus complexes. Ils ont avancé que si l'ammonium entraînait un phénomène de répression catabolique, là où l'urée n'avait aucun effet, le niveau de la régulation était alors fonction de la concentration extracellulaire en ions ammonium, et non intracellulaire. Il est donc fort probable que la dégradation de la caféine par *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25 soit régie par le même principe.

Seuls les travaux de ROUSSOS et coll. (1994) avaient précédemment porté sur l'effet de l'addition de sources simples d'azote sur la physiologie d'un microorganisme apte à dégrader la caféine. Ces auteurs ont étudié la même souche de *Penicillium* (*Penicillium* V33A25), en la cultivant sur de la pulpe de café par une technique de fermentation en milieu solide. Ils ont montré qu'après 72 heures de culture, la caféine n'est pas dégradée lorsque d'importantes quantités de sulfate d'ammonium et/ou d'urée sont ajoutées à la pulpe de café (à 3,75 et 1,75 % p/p respectivement) ; alors que dans le témoin, toute la caféine est éliminée. Dans ce cas, les auteurs ont conclu à un effet inhibiteur du sulfate d'ammonium mais également de l'urée. Cependant, il est vraisemblable qu'une hydrolyse partielle de l'urée lors de la stérilisation du milieu par autoclavage, ait libéré des ions ammonium dans la pulpe. Ce phénomène serait à l'origine de l'inhibition de la dégradation de la caféine observée dans le lot de pulpe supplémentée en urée uniquement.

Les mécanismes de régulation du métabolisme azoté par l'ammonium ont été par ailleurs largement étudiés chez les champignons filamenteux (SMITH et BERRY, 1976) ; tant au niveau de ses effets sur le métabolisme primaire (PATEMAN et coll., 1973 ; DOWNEY, 1978 ; CHOE et YOO, 1991) que sur le métabolisme secondaire (SANCHEZ et coll., 1981 ; ROLLINS et GAUCHER, 1994). L'ammonium peut agir en tant que répresseur de la synthèse d'enzymes, comme dans le cas de la nitrate réductase (SMITH et BERRY, 1976). Il peut également réprimer les systèmes de transport de métabolites, comme dans le cas du L-glutamate ou de l'urée chez *Aspergillus nidulans* (PATEMAN et coll., 1973). Par contre, l'ammonium n'est jamais cité comme inhibiteur direct d'enzymes.

Nous avons voulu dès lors compléter nos résultats obtenus *in vivo* à l'aide de tests réalisés *in vitro* sur des extraits intracellulaires bruts d'*Aspergillus* V12A25, afin notamment d'expliquer plus en détail le mode d'action de l'ammonium chez cette souche.

8.3.2. Etude *in vitro* de la régulation de la dégradation de la caféine chez *Aspergillus*

Nous venons de démontrer que la dégradation de la caféine est soumise à une régulation par l'ammonium chez les souches *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25. La recherche de l'activité caféine déméthylase réalisée sur des extraits intracellulaires bruts d'*Aspergillus* V12A25 cultivé dans différentes conditions, devrait nous permettre d'élucider certains aspects du mécanisme de régulation du catabolisme de la caféine, mis en jeu chez ce microorganisme.

8.3.2.1. Inductibilité ou constitutivité des activités déméthylasiques

A notre connaissance, le caractère inductible ou constitutif de la dégradation de la caféine n'a jamais été défini précisément chez aucun des microorganismes étudiés pour cette aptitude.

Dans ce but, nous avons essayé de mettre en évidence les activités caféine et théophylline déméthylases dans trois extraits intracellulaires bruts d'*Aspergillus* obtenus à partir de cultures sur trois milieux différents. Ces milieux avaient pour seule différence la nature de la source d'azote : la caféine, l'acide urique et l'urée. Leurs concentrations ont été calculées pour satisfaire le même rapport C/N que celui du milieu Caféine-Saccharose de base.

Il s'agissait donc des milieux :

- Caféine-Saccharose (CS)
- Acide Urique-Saccharose (AcUS) : acide urique à 0,866 g.l⁻¹
- Urée-Saccharose (US) : urée à 0,62 g.l⁻¹

L'urée a été choisie comme source alternative d'azote parce que sa structure chimique est très différente de la caféine. De plus, comme nous venons de le démontrer, elle n'inhibe pas la voie de dégradation de la caféine. Inversement, l'acide urique a été choisi parce que sa structure chimique est proche de celle de la triméthylxanthine (cf. Annexe 3), et qu'il fait vraisemblablement partie des premiers intermédiaires de cette voie catabolique. Nous avons voulu ainsi évaluer le degré de spécificité du mécanisme de reconnaissance de la caféine par le champignon, dans le cas où l'activité déméthylasique ne s'avérerait pas constitutive.

- Conditions opératoires

Les trois milieux de culture ont été ensemencés et incubés dans les conditions standards, pendant 37 heures. Le milieu US a été préparé comme indiqué dans le paragraphe 8.3.1.1.

Le traitement de la biomasse fraîche d'*Aspergillus* V12A25 a été réalisé dans les conditions définies au paragraphe 3.7.1. Les prélèvements ont néanmoins été de 40 ml de milieu pour les cultures en US et AcUS contre 80 ml pour la culture en CS ; car la biomasse produite était plus importante dans ces deux premiers milieux. Par ailleurs, le tampon phosphate utilisé contenait de l'acide ascorbique à 1 mM au lieu du Dithiothréitol.

L'activité caféine déméthylase a été testée sur les trois extraits bruts dans les conditions définies au paragraphe 3.7.2. Parallèlement, l'activité théophylline déméthylase a été testée sur les extraits bruts issus des cultures en CS et AcUS uniquement. Les essais ont été incubés à 30°C pendant 2 heures. Les échantillons ont enfin été traités et analysés dans les conditions décrites pour l'analyse en CCM (paragraphe 3.6.1.2. et 3.6.2.).

- Résultats expérimentaux et interprétation

Les activités caféine et théophylline déméthylases sont présentes dans les extraits intracellulaires bruts d'*Aspergillus* cultivé sur milieux Caféine-Saccharose et Acide Urique-Saccharose. Par contre, l'activité caféine déméthylase est absente de l'extrait brut d'*Aspergillus* cultivé sur urée comme seule source d'azote. L'urée n'ayant pas d'effet régulateur sur la dégradation de la caféine, nous pouvons alors conclure que chez *Aspergillus* V12A25, la biosynthèse des déméthylases impliquées dans la dégradation de la caféine est inductible.

On rappellera que l'inductibilité de ces enzymes par la caféine avait été suggérée lors de la mise au point de la technique d'analyse des décaféinases (paragraphe 7.2.2.3.). En effet, nous avons montré alors que les extraits intracellulaires bruts d'*Aspergillus* V12A25 ne présentaient plus d'activité caféine déméthylase lorsque la caféine avait totalement été épuisée du milieu de culture (Caféine-Saccharose) ayant servi à produire le mycélium.

Par ailleurs, les essais positifs obtenus sur l'extrait brut issu de la culture en milieu AcUS, démontrent que le mécanisme d'induction des décaféinases n'est pas très spécifique à la caféine ; et que la biosynthèse de ces enzymes peut être induite par l'acide urique, molécule chimiquement voisine de la caféine. Il est alors probable que la synthèse de l'urate oxydase, responsable de la transformation de l'acide urique en allantoïne, comme la synthèse de la (des) enzyme(s) impliquée(s) dans la déméthylation de la caféine, soient gouvernées par le même système d'activation au niveau génomique.

Ces résultats sont confortés par ceux de SCAZZOCCHIO et DARLINGTON (1968). Ces auteurs ont en effet démontré chez *Aspergillus nidulans* que toutes les enzymes impliquées dans la voie de dégradation de la xanthine en ammonium (excepté l'uréase) sont inductibles de manière non-spécifique. Ainsi ces auteurs ont établi que l'acide urique était inducteur de la synthèse de l'urate oxydase, mais aussi de la xanthine déshydrogénase, responsable de la formation de cet intermédiaire par oxydation de la xanthine. Les résultats similaires que nous obtenons sur l'effet inducteur de l'acide urique, confortent de ce fait l'hypothèse selon laquelle la voie de déméthylation de la caféine en xanthine et celle de dégradation des purines seraient intimement liées.

8.3.2.2. Mécanisme de régulation par l'ammonium

A l'aide d'une deuxième série d'essais, nous avons voulu élucider le mode d'action de l'ammonium ; et notamment définir s'il agissait en tant qu'inhibiteur direct du système enzymatique responsable de la déméthylation de la caféine, ou en tant que "répresseur" de la synthèse de ce système (ou plus exactement en tant que signal moléculaire à l'origine du blocage de cette synthèse).

- Conditions opératoires

Des cultures d'*Aspergillus* V12A25 en milieux CS et CS+100A ont été conduites dans les conditions standards. Les biomasses obtenues ont été traitées après 30 heures d'incubation (période pendant laquelle la caféine n'est pas dégradée dans le milieu CS+100A). La biomasse de trois cultures en milieu CS a été utilisée pour cet essai afin d'obtenir une quantité suffisante de matériel. Parallèlement, seule la biomasse d'une culture en milieu CS+100A a été utilisée.

La biomasse d'*Aspergillus* V12A25 a été ensuite traitée dans les conditions standards. Des essais enzymatiques pour la mise en évidence de l'activité caféine déméthylase ont été réalisés sur chaque extrait brut dans les conditions standards ; avec ou sans addition de sulfate d'ammonium dans le volume réactionnel, à 0,5 mM en concentration finale (quantité équimolaire à celle de la caféine). Enfin, le traitement et l'analyse des échantillons ont été réalisés dans les conditions décrites pour l'analyse par CCM (paragraphes 3.6.1.2. et 3.6.2.).

- Résultats expérimentaux et interprétation

L'activité caféine déméthylase est présente dans l'extrait intracellulaire brut issu de la culture en milieu Caféine-Saccharose. Elle n'est pas affectée par la présence d'ions ammonium (même intensité des taches correspondant à la théophylline). Par contre, il n'y a pas d'activité déméthylasique dans l'extrait brut issu de la culture en milieu CS+100A (stoppée avant le début de la dégradation de la caféine).

D'après ces résultats, on peut conclure que l'ammonium n'est pas un inhibiteur de la caféine déméthylase, mais qu'il agit globalement comme un agent répresseur de la synthèse du système impliqué dans le mécanisme de déméthylation de la caféine. Malheureusement, ces travaux ne permettent pas de définir si la répression par l'ammonium porte directement sur la synthèse des enzymes responsables de la *N*-déméthylation de la caféine, ou bien sur les systèmes de reconnaissance ou de transport de la caféine au niveau de la paroi fongique (ou encore une combinaison des deux). Dans le deuxième cas, la caféine ne pourrait pas jouer son rôle d'inducteur, et par voie de conséquence, il n'y aurait pas de synthèse de la (des) décaféinase(s).

A notre connaissance, l'existence d'un transport actif de la caféine n'a jamais été établie pour les microorganismes. Toutefois, de tels systèmes ont été décrits pour d'autres purines. Ainsi, DARLINGTON et SCAZZOCCHIO (1967) ont démontré l'existence de deux systèmes de transport chez *Aspergillus nidulans* : l'un plutôt spécifique à l'hypoxanthine, l'adénine et la guanine ; l'autre plutôt spécifique à la xanthine et à l'acide urique. Ces auteurs n'excluaient cependant pas la possibilité d'une diffusion passive de ces composés à travers la paroi du champignon.

Par ailleurs, SCAZZOCCHIO et DARLINGTON (1968) ont démontré l'effet répresseur de l'ammonium sur toutes les enzymes de la voie de dégradation des purines, sans pour autant préciser son niveau exact d'action. PATEMAN et coll. (1973) ont par la suite établi que l'ammonium extracellulaire réprimait entre autres le système de transport de l'urée et la synthèse de la xanthine déshydrogénase.

8.4. CONCLUSION

Au terme d'études visant à identifier les premiers intermédiaires métaboliques issus de la dégradation de la caféine par *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25, un schéma du catabolisme de la caféine commun aux deux champignons filamenteux, a été proposé (Figure 8.2). Les principaux composés formés par réactions successives de type *N*-déméthylation, sont la théophylline et la 3-méthylxanthine ; comme cela a déjà été observé dans le cas d'autres souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium* (INA, 1971 ; SCHWIMMER et coll., 1971).

Nous avons démontré chez *Aspergillus* V12A25 que le système enzymatique impliqué dans la déméthylation de la caféine est inductible par ce substrat, mais également par l'acide urique (intermédiaire probable dans la voie métabolique de la caféine). Par contre, l'urée (autre intermédiaire probable) n'a pas d'effet inducteur.

De plus, l'urée n'a pas d'effet inhibiteur sur la dégradation de la caféine par *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25. Par contre, le métabolisme de la caféine est soumis à une régulation par les ions ammonium présents dans le milieu extracellulaire. Cette régulation se traduit par une inhibition de la dégradation de la purine, dont la levée n'est obtenue qu'après assimilation complète de l'ammonium. De plus, l'addition de sulfate d'ammonium au milieu de base Caféine-Saccharose entraîne des modifications morphologiques importantes chez les deux souches.

Enfin, nous avons démontré chez *Aspergillus* V12A25 que l'ammonium n'est pas un inhibiteur direct de la caféine déméthylase. Par contre, il présente un effet répresseur certain, dont la nature exacte reste cependant à établir : l'effet répresseur pouvant être "direct" (répression portant sur la synthèse d'enzymes impliquées dans la voie catabolique de la caféine), et/ou "indirect" (inhibition ou répression du système impliqué dans le transport de la caféine à travers la paroi fongique).

Le mécanisme de régulation de la dégradation de la caféine apparaît donc très complexe. Les travaux présentés dans ce chapitre auront néanmoins permis de dégager certains aspects importants de son fonctionnement ; ce qui n'avait jamais été réalisé chez d'autres microorganismes aptes à dégrader la caféine.

CONCLUSION

GENERALE

9. CONCLUSION GENERALE

La caféine ou 1,3,7-triméthylxanthine est en grande partie responsable de la toxicité de la pulpe de café, à cause de ses nombreux effets anti-physiologiques. C'est pourquoi, malgré un important potentiel nutritionnel, ce principal sous-produit de l'agro-industrie du café n'a pas été utilisé comme complément en alimentation animale, jusqu'à ce qu'une équipe de chercheurs mettent en évidence la possibilité de décaféiner la pulpe de café à l'aide de champignons filamenteux (AQUIAHUATL et coll., 1988).

Une telle propriété est assez rare chez les champignons comme chez la plupart des microorganismes. Peu d'études ont été réalisées sur ce thème, contrairement aux nombreux travaux effectués chez l'homme et les animaux de laboratoire. Il devenait donc intéressant d'étudier la physiologie de croissance de ces champignons filamenteux cultivés sur un milieu synthétique à base de caféine, afin de comprendre et de mieux cerner les mécanismes de dégradation de cet alcaloïde et de maîtriser tous les facteurs externes pouvant l'influencer.

Deux microorganismes, *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25, ont été préalablement sélectionnés pour cette étude dans le but de comparer leur comportement respectif vis-à-vis de la caféine, et de définir si les mécanismes mis en jeu par ces souches appartenant aux deux genres de champignons filamenteux les plus couramment rencontrés en agro-alimentaire, étaient similaires.

Une approche systématique nous a permis dans un premier temps de caractériser ces deux souches sauvages sur la base de critères morpho-physiologiques observés pour des cultures en milieux gélosés standards. L'analyse taxonomique permet de rapprocher la souche V12A25 de l'espèce *Aspergillus tamaritii* ou de l'espèce *Aspergillus oryzae* (d'après RAPER et FENNELL, 1965) ; et la souche V33A25 de l'espèce *Penicillium crustosum* (d'après PITT, 1979). Par ailleurs, la croissance apicale et l'indice de sporulation de ces souches sont différents et révèlent qu'*Aspergillus* V12A25 envahit rapidement la surface des milieux de culture avec une faible production de conidies, alors que *Penicillium* V33A25 présente un comportement inverse.

Ces premières caractéristiques établies, nous avons mis au point deux méthodes d'analyse de la caféine et de ses dérivés potentiels (les di- et monométhylxanthines) qui devaient nous servir à définir le comportement des champignons cultivés en présence de caféine.

Une première méthode par chromatographie liquide haute performance a été optimisée pour le dosage quantitatif des méthylxanthines. La séparation de toutes les méthylxanthines entre elles ainsi que d'un étalon interne (la β -hydroxyéthylthéophylline) a été obtenue à l'aide d'un système d'élution par gradient, avec une très bonne résolution.

Une deuxième méthode par chromatographie sur couche mince a été développée, principalement dans le but d'analyser rapidement les résultats de tests enzymatiques. Bien que qualitative, cette méthode est très sensible pour la détection des activités caféine déméthylase. Ceci est dû en grande partie à une étape préalable d'extraction/concentration des méthylxanthines, qui permet de récupérer 100 % du principal produit de dégradation de la caféine (la théophylline).

A l'aide de ces deux méthodes d'analyse de la caféine et de ses dérivés, nous avons été en mesure d'établir les principaux paramètres de culture conduisant à une utilisation optimale de la caféine par les deux champignons filamenteux. Les conclusions de cette étude sont les suivantes :

- les deux souches sont capables de se développer dans un milieu liquide synthétique de base, contenant de la caféine comme unique source d'azote ; mais ne peuvent utiliser à la fois celle-ci comme source de carbone (même en concentrations non toxiques).
- les facteurs qui influencent fortement la dégradation de la caféine par les microorganismes sont la concentration initiale en caféine, la température d'incubation, l'addition d'oligo-éléments et la co-présence d'ions ammonium.

Ainsi, il a été démontré que la principale caractéristique physiologique qui distingue les deux champignons filamenteux est le seuil de résistance à la caféine. *Penicillium* V33A25 résiste mieux aux concentrations élevées en caféine puisque sa croissance est inhibée pour des teneurs comprises entre 20 et 50 g.l⁻¹, alors que celle d'*Aspergillus* V12A25 est inhibée pour des teneurs comprises entre 10 et 20 g.l⁻¹. L'adaptation à la caféine de *Penicillium* V33A25 se traduit par de faibles modifications morphologiques, beaucoup moins marquées que celles observées chez *Aspergillus* V12A25 cultivé à plus de 5 g.l⁻¹. D'une manière générale, sur le plan morphologique, *Penicillium* V33A25 se distingue d'*Aspergillus* V12A25 par l'absence de production de formes de reproduction asexuée, lorsqu'il est cultivé sur un milieu liquide contenant de la caféine. Par contre, les pelotes mycéliennes formées par *Aspergillus* en milieu liquide sont plus lâches que celles formées par *Penicillium*, facilitant de ce fait les échanges entre le milieu de culture et le microorganisme.

Malgré ces différences de résistance vis-à-vis des concentrations élevées en caféine, des performances identiques sont enregistrées pour ces deux souches en matière de vitesse maximale de dégradation de la caféine. Celles-ci sont de l'ordre de 85 mg.l⁻¹.h⁻¹ et sont obtenues pour des concentrations initiales en caféine voisines de 5 g.l⁻¹.

Les températures optimales de croissance sont respectivement comprises entre 20 et 25°C pour *Penicillium* V33A25 et entre 25 et 30°C pour *Aspergillus* V12A25. A 35°C, la germination des conidies de *Penicillium* V33A25 est totalement inhibée. A cette température la croissance d'*Aspergillus* V12A25 et la vitesse de dégradation de la caféine sont ralenties.

L'addition dans le milieu de culture de base d'une solution complexe d'oligoéléments comprenant essentiellement du fer, du zinc, du manganèse, du cuivre voire du calcium est indispensable à la bonne croissance des deux champignons dans un tel milieu synthétique. Par contre, le cobalt et le molybdène ne présentent aucun intérêt.

Chez *Penicillium* V33A25, la dégradation de la caféine est accélérée par l'ajout de sulfate d'ammonium à $0,136 \text{ g.l}^{-1}$. Chez *Aspergillus* V12A25, la présence d'ions ammonium dans le milieu de culture s'avère rapidement néfaste pour des teneurs supérieures à cette concentration.

En fait, au cours d'une étude plus approfondie, il a été démontré que la présence d'ions ammonium dans le surnageant de culture inhibe la dégradation de la caféine chez les deux champignons ; cette inhibition n'étant levée qu'après une complète disparition de ces ions. A l'inverse, l'urée ne présente aucun effet inhibiteur ; ce composé est utilisé conjointement à la caféine par les deux champignons. De plus, l'addition de sulfate d'ammonium au milieu de culture de base entraîne des modifications importantes de la morphologie des souches (Figure 8.7). On soulignera entre autres chez *Penicillium* V33A25 un développement mycélien sous forme de réseau qui est vraisemblablement à l'origine de l'accroissement de la vitesse maximale de dégradation de la caféine par cette souche, lorsqu'elle est cultivée dans de telles conditions (caféine + ammonium).

Enfin, les paramètres suivants présentent des effets plus modérés sur la dégradation de la caféine, et peuvent influencer la production de biomasse :

- un taux d'inoculation de 10^6 conidies.ml⁻¹ initialement produites après 4 à 7 jours d'incubation sur un milieu de culture semi-synthétique (Café Moulu-Saccharose), apparaît optimal pour une dégradation rapide de la caféine et un développement homogène des champignons.
- l'utilisation du saccharose plutôt que celle du glucose comme source de carbone favorise légèrement la croissance des deux microorganismes. La concentration initiale de la source de carbone influence peu la dégradation de la caféine (entre 5 et 30 g.l^{-1}). Par contre, elle détermine la quantité finale de biomasse. Pour une concentration initiale en saccharose de 30 g.l^{-1} , les biomasses maximales ont été de 10 g.l^{-1} (poids sec) environ pour chaque souche. Dans ces conditions, il est possible d'obtenir une dégradation complète et sans ralentissement de la caféine initialement présente entre 3 et 4 g.l^{-1} ; ce qui correspond à un rapport C/N compris entre 17 et 13.
- un pH initial acide (≈ 4) du milieu de culture permet d'éviter la production de pigments par les champignons en fin de croissance. Ces pigments sont sources d'interférences lors des analyses par CLHP.

L'ensemble de ces observations démontre une certaine similarité dans le comportement d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 vis-à-vis de la caféine, principalement lorsque celle-ci est utilisée en condition non toxique. Cette similitude se retrouve au niveau du mécanisme de dégradation de la caféine.

L'identification par CLHP des composés retrouvés dans le surnageant de culture a permis de démontrer que les premières étapes de dégradation de la caféine sont identiques chez les deux champignons filamenteux. Ces derniers procèdent à des *N*-déméthylations successives de la 1,3,7-triméthylxanthine, qui conduisent principalement à la formation de 1,3-diméthylxanthine (ou théophylline) puis de 3-méthylxanthine. La confrontation entre nos résultats et les données de la littérature nous a permis d'établir un schéma complet des différents intermédiaires cataboliques de la caféine chez *Aspergillus* V12A25 et *Penicillium* V33A25 (Figure 8.3). Cette voie de dégradation de la caféine semble commune aux champignons filamenteux appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (INA, 1971 ; SCHWIMMER et coll., 1971). Par contre, elle se distingue nettement de celle empruntée par certaines bactéries (*Pseudomonas putida*) ou de celle, plus complexe, retrouvée chez l'homme. Cette observation suggère que les mécanismes de déméthylation de cet alcaloïde sont différents d'un type d'organisme à un autre.

La nature des principales méthylxanthines produites à partir de la caféine par *Aspergillus* V12A25 a pu être confirmée à l'aide de tests enzymatiques. Ces tests, dont la mise au point a été réalisée au cours de ce travail, ont permis pour la première fois de caractériser l'activité caféine déméthylase issue d'un champignon filamenteux.

Cette activité semble très originale et se distingue parfois sensiblement des autres activités déméthylasiques décrites sur des cellules eucaryotes. Ainsi, l'activité caféine déméthylase d'*Aspergillus* cultivé dans un milieu liquide à base de caféine apparaît cytoplasmique, et non liée à une structure membranaire. Par ailleurs, si le NADPH permet d'augmenter d'un facteur de 2,5 l'activité de base d'un extrait intracellulaire brut, il semble qu'un autre cofacteur soit indispensable à la mise en évidence de cette activité, contrairement à ce qu'ont pu montrer ASANO et coll. (1994) chez une souche de *Pseudomonas putida*, SAUER et coll. (1982) chez une souche de *Saccharomyces uvarum*, ou BERTHOU et coll. (1989) sur des microsomes hépatiques humains.

Les autres caractéristiques de l'activité caféine déméthylase isolée d'*Aspergillus* V12A25 sont les suivantes :

- température optimale de la réaction comprise entre 30 et 32 °C
- pH optimal de la réaction compris entre 7,3 et 7,5
- forte sensibilité aux températures positives et à l'augmentation de la force molaire
- conservation satisfaisante de l'activité par congélation ou par lyophilisation de l'extrait brut

- effet protecteur de l'acide ascorbique et du dithiothréitol
- possible effet activateur de l'ion Fe^{2+}
- effets inhibiteurs de l'EDTA et de certains ions (Hg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+})
- poids moléculaire de l'enzyme responsable de la déméthylation de la caféine estimé entre 20 et 45 kDa, en première approximation.

Les deux derniers points divergent sensiblement des observations faites sur d'autres organismes dégradant la caféine. Ces résultats ne peuvent que renforcer l'hypothèse de l'existence de systèmes de déméthylation spécifiques à chaque type d'organisme.

Nous avons démontré que le système enzymatique d'*Aspergillus* V12A25 est inductible. Par ailleurs, l'activité caféine déméthylase du champignon disparaît rapidement lorsque toute la caféine a été consommée dans le milieu de culture. Outre la caféine, l'acide urique peut induire la synthèse des décaféinases. Par contre, l'urée n'a pas d'effet inducteur. Nous avons souligné précédemment que le métabolisme de la caféine des deux champignons est soumis à une régulation par les ions ammonium. A l'aide de tests enzymatiques réalisés sur des extraits intracellulaires bruts d'*Aspergillus* V12A25, nous avons démontré que ces ions ont un effet répresseur vraisemblablement sur la synthèse des décaféinases, comme dans le cas des enzymes de la voie de dégradation de la xanthine (SCAZZOCCHIO et DARLINGTON, 1968).

En conclusion de ce travail, nous pouvons avancer les perspectives suivantes en ce qui concerne la production de décaféinases par des champignons filamenteux :

- la production de décaféinases en milieu liquide est fortement affectée par des problèmes d'inhibition dus à la présence d'ions ammonium dans le milieu extracellulaire. Un résultat similaire a été observé lorsque ces microorganismes sont cultivés par fermentation en milieu solide (FMS) sur de la pulpe de café supplémentée en sulfate d'ammonium (ROUSSOS et coll., 1994). Il serait intéressant de vérifier si d'autres composés peuvent également inhiber la synthèse de ces enzymes et, à terme, de rechercher des souches déréprimées.
- les décaféinases produites en milieu liquide sont intracellulaires et très sensibles aux conditions environnementales. Si ces caractéristiques devaient se confirmer en milieu solide, cela ne serait pas en faveur d'une éventuelle valorisation de la pulpe de café comme substrat pour la production de telles enzymes. Cependant, il serait intéressant de procéder à des essais de caractérisation de l'activité caféine déméthylase produite par FMS. En effet, plusieurs études ont démontré par le passé que des champignons filamenteux cultivés sur un support solide sécrètent certaines enzymes dans le milieu environnant, alors qu'en conditions submergées, ces mêmes enzymes restent intracellulaires.

Par ailleurs, les enzymes produites par FMS sont plus stables et présentent de meilleures activités que les mêmes enzymes produites en milieu liquide (ALAZARD et RAIMBAULT, 1981 ; LEKHA et LONSANE, 1994).

- les caractéristiques très originales de l'activité caféine déméthylase rencontrées lors des essais préliminaires de purification des décaféinases, soulignent l'intérêt de poursuivre les recherches dans ce domaine. Celles-ci doivent passer par l'optimisation de la technique de récupération des enzymes et du maintien de l'activité. L'identification du (des) cofacteur(s) indispensable(s) à la mise en évidence de ces activités déméthylasiques représente également une étape importante de la caractérisation des décaféinases produites par *Aspergillus* V12A25.
- enfin, nous avons initialement envisagé la production de certains métabolites issus de la déméthylation enzymatique de la caféine (di- et mono-méthylxanthines) comme un moyen de valoriser la pulpe de café. Certains essais réalisés au cours d'un plan d'expérience visant à optimiser les conditions de culture, ont montré que pour des conditions limitantes, la dégradation de la caféine peut être ralentie ce qui permet une importante accumulation de théophylline et de 3-méthylxanthine dans le surnageant de culture. Ces molécules présentant des effets pharmacologiques parfois différents de ceux de la caféine, il serait donc intéressant de poursuivre les recherches dans ce domaine. Pour ce faire, l'isolement de souches mutantes est à envisager. Par ailleurs, la caractérisation complète du système enzymatique responsable de la dégradation de la caféine chez ces champignons filamenteux permettra d'orienter le métabolisme de ces microorganismes vers la production de tel ou tel métabolite en bloquant biochimiquement la voie de dégradation au stade désiré (comme dans le cas d'une souche de *Pseudomonas putida* étudiée par ASANO et coll., 1993).

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

10. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AESCHBACHER H.U. (1988) Mutagenicity of coffee. 195-213. *In* : CLARKE R.J., MACRAE R. (1988) Coffee. Volume 3. Elsevier Applied Science, London, New-York.
- AGÚNDEZ J.A.G., LUENGO A., BENÍTEZ J. (1992) Caffeine demethylase activity in human and dark agouti rat liver microsomes. Comparison with aminopyrine *N*-demethylase activity. *Drug Metab. Dispos.*, **20** (3), 343-349.
- AINSWORTH G.C., SUSSMAN A.S. (1965) The fungi. An advanced treatise. Volume 1. Academic press, New-York, London, Toronto, Sydney, San Francisco.
- AINSWORTH G.C., SPARROW F.K., SUSSMAN A.S. (1973) The fungi. An advanced treatise. Volume IVA. Academic press, New-York, San Francisco, London.
- ALAZARD D., RAIMBAULT M. (1981) Comparative study of amylolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state cultivation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 113-117.
- ALEXOPOULOS C.J., MIMS C.W. (1979) Introductory mycology. Third edition. John Wiley & Sons, New-York, Chichester, Brisbane, Toronto.
- ALLAM A.M., ELZAINY T.A. (1969) Degradation of xanthine by *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.*, **56**, 293-300.
- AOYAMA Y., YOSHIDA Y., SATO R. (1984) Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 α -demethylation. II. Lanosterol metabolism by purified P-450_{14DM} and by intact microsomes. *J. Biol. Chem.*, **259** (3), 1661-1666.
- AQUIAHUATL M.A. (1992) Detoxificación de la pulpa de café : morfología, fisiología y bioquímica de hongos filamentosos que degradan la cafeína. Tesis de Maestría en Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 71 p.
- AQUIAHUATL M.A., RAIMBAULT M., ROUSSOS S., TREJO M.R. (1988) Coffee pulp detoxification by solid state fermentation: isolation, identification and physiological studies. 13-26. *In* : RAIMBAULT M. (1988) Solid state fermentation in bioconversion of agro-industrial raw materials. Proceedings of the seminar, 25-27 July 1988, ORSTOM, Montpellier, France.

- ARAMAKI S., SUZUKI E., ISHIDAKA O., MOMOSE A., UMEMURA K. (1991) Pharmacokinetics of caffeine and its metabolites in horses after intravenous, intramuscular or oral administration. *Chem. Pharm. Bull.*, **39** (11), 2999-3002.
- ARNAUD M.J. (1984) Products of metabolism of caffeine. 3-38. *In* : DEWS P.B. (1984) Caffeine. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, Tokyo.
- ARNAUD M.J. (1987) The pharmacology of caffeine. *Prog. Drug Res.*, **31**, 273-313.
- ARNAUD M.J. (1993) Metabolism of caffeine and other components of coffee. 43-95. *In* : GARATTINI S. (1993) Caffeine, coffee and health. Raven Press, New-York.
- ASANO Y., KOMEDA T., YAMADA H. (1993) Microbial production of theobromine from caffeine. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57** (8), 1286-1289.
- ASANO Y., KOMEDA T., YAMADA H. (1994) Enzymes involved in theobromine production from caffeine by *Pseudomonas putida* No. 352. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58** (12), 2303-2304.
- BARONE J.J., GRICE H.C. (1990) Meeting report. Sixth international caffeine workshop, Hong-Kong, 7-10 August 1989. *Food Chem. Toxicol.*, **28** (4), 279-283.
- BARTHOMEUF C., REGERAT F., POURRAT H. (1994) Improvement in tannase recovery using enzymatic disruption of mycelium in combination with reverse micellar enzyme extraction. *Biotechnol. Tech.*, **8** (2), 137-142.
- BAUMANN T.W., FRISCHKNECHT P.M. (1988) Caffeine : production by plant (*Coffea* spp.). Cell cultures. 264-281. *In* : BAJAJ Y.P.S. (1988) Biotechnology in agriculture and forestry. Volume 4. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- BAUMANN T.W., GABRIEL H. (1984) Metabolism and excretion of caffeine during germination of *Coffea arabica* L. *Plant Cell Physiol.*, **25** (8), 1431-1436.
- BAUMANN T.W., KOETZ R., MORATH P. (1983) N-methyltransferase activities in suspension cultures of *Coffea arabica* L. *Plant Cell Rep.*, **2**, 33-35.
- BAUMANN T.W., WANNER H. (1972) Untersuchungen über den transport von kaffein in der kaffee-pflanze (*Coffea arabica*). *Planta*, **108**, 11-20.
- BENKŐ Z., SIPICZKI M. (1993) Caffeine tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*: physiological adaptation and interaction with theophylline. *Can. J. Microbiol.*, **39** (5), 551-554.

- BERG A., CARLSTÖM K., GUSTAFSSON J.-A., INGELMAN-SUNDBERG M. (1975) Demonstration of a cytochrome P-450-dependent steroid 15 α -hydroxylase in *Bacillus megaterium*. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **66** (4), 1414-1423.
- BERODE M., BOILLAT M.-A., GUILLEMIN M.P., WU M.-M., SAVOLAINEN H. (1990) Demethylation pathways in caffeine metabolism as indicators of variability in 1,1,1-trichloroethane oxidation in man. *Pharmacol. Toxicol.*, **67** (1), 41-46.
- BERTHOUS F., RATANASAVANH D., RICHE C., PICART D., VOIRIN T., GUILLOUZO A. (1989) Comparison of caffeine metabolism by slices, microsomes and hepatocyte cultures from adult human liver. *Xenobiotica*, **19** (4), 401-417.
- BLECHER R., LINGENS F. (1977) The metabolism of caffeine by a *Pseudomonas putida* strain. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 807-817.
- BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GUY P., LARPENT J.P., VEAU P. (1985) Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson, Paris, New-York, Barcelone, Milan, Mexico, Sao Paulo.
- BRADFORD M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- BRESSANI R. (1978) Factores antifisiológicos de la pulpa de café. 143-152. In : BRAHAM J.E., BRESSANI R. (1978) Pulpa de café. Composición, tecnología y utilización. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Bogota.
- BUCHANAN R.L., FLETCHER A.M. (1978) Methylxanthine inhibition of aflatoxin production. *J. Food Sci.*, **43** (2), 654-655.
- BUCHANAN R.L., HARRY M.A., GEALT M.A. (1983a) Caffeine inhibition of sterigmatocystin, citrinin, and patulin production. *J. Food Sci.*, **48**, 1226-1228.
- BUCHANAN R.L., HOOVER D.G., JONES S.B. (1983b) Caffeine inhibition of aflatoxin production: mode of action. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46** (5), 1193-1200.
- BUCHANAN R.L., TICE G., MARINO D. (1981) Caffeine inhibition of ochratoxin A production. *J. Food Sci.*, **47**, 319-321.
- BUCHANAN R.L., ZAIKA L.L., KUNSCH C.A., PURCELL C.J., MERTZ S.E. (1987) Isolation of a caffeine-resistant mutant of *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Sci.*, **52** (1), 194-196.

- CABEZAS M.T., FLORES A., EGAÑA J.E. (1978) Uso de la pula de café en alimentación de rumientes. 45-67. In : BRAHAM J.E., BRESSANI R. (1978) Pulpa de café. Composición, tecnología y utilización. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Bogota.
- CARBÓ M., SEGURA J., DE LA TORRE R. (1989) La caféine, données de base et facteurs capables de les modifier. *Science & Sports*, 4 (1), 7-13.
- CHOE J., YOO Y.J. (1991) Effect of ammonium ion concentration and application to fed-batch culture for overproduction of citric acid. *J. Ferment. Bioeng.*, 72 (2), 106-109.
- CLEMENS S., HINDERER W., WITTKAMPF U., BARZ W. (1993) Characterization of cytochrome P450-dependent isoflavone hydroxylases from chickpea. *Phytochemistry*, 32 (3), 653-657.
- COHEN Y. (1986) Abrégé de pharmacologie. 2e édition révisée et augmentée. Masson, Paris, New-York, Barcelone, Milan, Mexico, Sao Paulo.
- CONSTANT C. (1990) Assurance qualité et méthodes d'expérimentation. Université de Technologie de Compiègne, France.
- COTTON P.R., DURAND N., FEVRE M. (1993) Protoplastes fongiques. *L'Information du Biotechnicien*, 1 (4), 185-191.
- COUGHLIN J.R. (1987) Methylene chloride. A review of its safety in coffee decaffeination. 127-140. ASIC, 12e Coll. Sci. Int. sur le Café, 06-29 Déc. 1987, Montreux, France.
- DALY J.W. (1993) Mecanism of action of caffeine. 97-150. In : GARATTINI S. (1993) Caffeine, coffee and health. Raven Press, New-York.
- DARLINGTON A.J., SCAZZOCCHIO C. (1967) Use of analogues and the substrate-sensitivity of mutants in analysis of purine uptake and breakdown in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.*, 93 (3), 937-940.
- DEBRY G. (1993) Le café et la santé. John Libbey Eurotext, Paris.
- DE MARIA C.A.B., TRUGO L.C., MOREIRA R.F.A., PETRACCO M. (1995) Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high performance gel filtration chromatography. *Food Chem.*, 52 (4), 447-449.
- DENIS S. (1992) La dégradation de la caféine par deux champignons filamenteux : *Aspergillus oryzae* et *Penicillium roquefortii*. Approches physiologiques et biochimiques. Diplôme d'Etudes Approfondies, Université de Montpellier II, France, 30 p.
- DEWS P.B. (1984) Caffeine. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, Tokyo.

- DOBROCKY P., BENNETT P.N., NOTARIANNI L.J. (1994) Rapid method for the routine determination of caffeine and its metabolites by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed.*, **652** (1), 104-108.
- DOMSCH K.H., GAMS W., ANDERSON T.H. (1980) Compendium of soil fungi. Volume I. Academic press, London, New-York, Toronto, Sydney, San Francisco.
- DOWNEY R.J. (1978) Control of fungal nitrate reduction. 320-323. In : SCHLESSINGER D. (1978) Microbiology - 1978. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SIMTH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
- FONNE-PFISTER R., SIMON A., SALAUN J.-P., DURST F. (1988) Xenobiotic metabolism in higher plants. Involvement of microsomal cytochrome P-450 in aminopyrine N-demethylation. *Plant Sci.*, **55**, 9-20.
- FRANKE W., HAHN G.E. (1955) Untersuchungen zum bakteriellen purin-abbau II. Über den abbau von amino-, oxy-, und methyl-purinen durch *Pseudomonas aeruginosa* (B. pyocyaneum). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **301**, 90-106.
- FRISCHKNECHT P.M., BAUMANN T.W. (1979) Synthesis of [2-¹⁴C]theobromine. *J. Labelled Compd Rad.*, **16** (5), 669-672.
- FRISCHKNECHT P.M., BAUMANN T.W. (1980) The pattern of purine alkaloid formation in suspension cultures of *Coffea arabica*. *Planta Med.*, **40**, 245-249.
- FUHR U., DOEHMER J., BATTULA N., WÖLFEL C., KUDLA C., KEITA Y., STAIB A.H. (1992) Biotransformation of caffeine and theophylline in mammalian cell lines genetically engineered for expression of single cytochrome P450 isoforms. *Biochem. Pharmacol.*, **43** (2), 225-235.
- FUJIMORI N., ASHIHARA H. (1994) Biosynthesis of theobromine and caffeine in developing leaves of *Coffea arabica*. *Phytochemistry*, **36** (6), 1359-1361.
- GALASKO G.T.F., FURMAN K.I., ALBERTS E. (1989) The caffeine contents of non-alcoholic beverages. *Food Chem. Toxicol.*, **27** (1), 49-51.
- GARATTINI S. (1993) Caffeine, coffee, and health. Raven Press, New-York.
- GLÜCK M., LINGENS F. (1987) Studies on the microbial production of theobromine and heteroxanthine from caffeine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 334-340.
- GLÜCK M., LINGENS F. (1988) Heteroxanthinedemethylase, a new enzyme in the degradation of caffeine by *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 59-62.

- GRANT D.M., CAMPBELL M.E., TANG B.K., KALOW W. (1987) Biotransformation of caffeine by microsomes from human liver. *Biochem. Pharmacol.*, **36** (8), 1251-1260.
- GUAN J., STEHMANN C., ELLIS S.W., KERKENAAR A., DE WAARD M.A. (1992) Ergosterol biosynthesis in a cell-free preparation of *Penicillium italicum* and its sensitivity to DMI fungicides. *Pestic. Biochem. Phys.*, **42**, 262-270.
- HAYNES R.H., COLLINS J.D.B. (1984) The mutagenic potential of caffeine. 221-238. In : DEWS P.B. (1984) Caffeine. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, Tokyo.
- HARRIS E.L.V., ANGAL S. (1989) Protein purification methods: a practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New-York, Tokyo.
- HOHNLOSER W., OSSWALD B., LINGENS F. (1980) Enzymological aspects of caffeine demethylation and formaldehyde oxidation by *Pseudomonas putida* C1. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361**, 1763-1766.
- HOROWITZ J.B., VILKER V.L. (1993) Development of bacterial cytochrome P-450_{cam} (cytochrome m) production. *Biotechnol. Bioeng.*, **41** (4), 411-421.
- HURST W.J., MARTIN Jr. R.A. (1993) The quantitative determination of caffeine in beverages using capillary electrophoresis. *Analisis*, **21** (9), 389-391.
- I.F.T.E.P.F.S.N., Institute of Food Technologists' Expert Panel on Food Safety and Nutrition (1983) Caffeine. A scientific status summary. *Food Technol.*, **37** (4), 87-91.
- INA K. (1971) Biochemical studies of caffeine. Degradation of caffeine by mold. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **45** (8), 378-380.
- ISHLER N.H., FINUCANE T.P., BORKER E. (1948) Rapid spectrophotometric determination of caffeine. *Anal. Chem.*, **20** (12), 1162-1166.
- JAMES J.E. (1991) Caffeine and health. Academic Press, London, San Diego, New-York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto.
- JOHANNSEN M., BRUNNER G. (1994) Solubilities of the xanthines caffeine, theophylline and theobromine in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilibria*, **95**, 215-226.
- JOHANNSEN M., BRUNNER G. (1995) Measurements of solubilities of xanthines in supercritical carbon dioxide + methanol. *J. Chem. Eng. Data*, **40** (2), 431-434.
- KAPTEYN J.C., PILLMOOR J.B., DE WAARD M.A. (1992) Isolation of microsomal cytochrome-P450 isozymes from *Ustilago maydis* and their interaction with sterol demethylation inhibitors. *Pestic. Sci.*, **34**, 37-43.

- KATZ S.N. (1987) Decaffeination of coffee. 59-71. In : CLARKE R.J., MACRAE R. (1987) Coffee. Volume 2. Elsevier Applied Science, London, New-York.
- KHILMAN B.A. (1974) Effects of caffeine on the genetic material. *Mutat. Res.*, **26**, 53-71.
- KISHIMOTO D., OKU A., KURIHARA N. (1995) Enantiotopic selectivity of cytochrome P450-catalyzed oxidative demethylation of methoxychlor: alteration of selectivity depending on isozymes and substrate concentrations. *Pestic. Biochem. Phys.*, **51** (1), 12-19.
- KOCH A.L. (1956) The metabolism of methylpurines by *Escherichia coli*. 1. Tracer studies. *J. Biol. Chem.*, **219**, 181-188.
- KOZAKIEWICZ Z., SMITH D. (1994) Physiology of *Aspergillus*. In : SMITH J.E. (1994) Biotechnology handbooks. Volume 7. Plenum Press, New-York, London.
- KURTZMAN R.H., SCHWIMMER S. (1971) Caffeine removal from growth media by microorganisms. *Experientia*, **27** (4), 481-482.
- LARPENT-GOURGAUD M., SANGLIER S.S. (1992) Biotechnologies. Principes et méthodes. Collection Biosciences et Techniques, Doin éditeurs, Paris.
- LASKIN A.I., LECHEVALIER H.A. (1978) CRC Handbook of microbiology. 2nd edition. Volume 2. CRC Press, Palm Beach, Florida.
- LEHNINGER A.L., NELSON D.L., COX M.M. (1994) Principes de biochimie. Traduction de la 2e édition. Médecine-Sciences, Flammarion.
- LEKHA P.K., LONSANE B.K. (1994) Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Process Biochem.*, **29** (6), 497-503.
- LELO A., KJELLEN G., BIRKETT D.J., MINERS J.O. (1989) Paraxanthine metabolism in humans: determination of metabolic partial clearances and effects of allopurinol and cimetidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **248** (1), 315-319.
- LELO A., MINERS J.O., ROBSON R.A., BIRKETT D.J. (1986) Quantitative assessment of caffeine partial clearances in man. *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, **22**, 183-186.
- LIU W., ROSAZZA J.P.N. (1993) A soluble *Bacillus cereus* cytochrome P-450_{cin} system catalyzes 1,4-cineole hydroxylations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** (11), 3889-3893.
- MACRAE R. (1985) Nitrogenous components. 115-152. In : CLARKE R.J., MACRAE R. (1985) Coffee. Volume 1. Elsevier Applied Science, London, New-York.

- MALONEY A.P., VAN ETTEN H.D. (1994) A gene from the fungal plant pathogen *Nectria haematococca* that encodes the phytoalexin-detoxifying enzyme pisatin demethylase defines a new cytochrome P450 family. *Mol. Gen. Genet.*, **243** (5), 506-514.
- MATTHEWS D.E., VAN ETTEN H.D. (1983) Detoxification of the phytoalexin pisatin by a fungal cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.*, **224** (2), 494-505.
- MAZZAFERA P., CROZIER A., MAGALHAES A.C. (1991) Caffeine metabolism in *Coffea arabica* and other species of coffee. *Phytochemistry*, **30** (12), 3913-3916.
- MAZZAFERA P., CROZIER A., SANDBERG G. (1994a) Studies on the metabolic control of caffeine turnover in developing endosperms and leaves of *Coffea arabica* and *Coffea dewevrei*. *J. Agr. Food Chem.*, **42** (7), 1423-1427.
- MAZZAFERA P., WINGSLE G., OLSSON O., SANDBERG, G. (1994b) S-adenosyl-L-methionine: theobromine 1-N-methyltransferase, an enzyme catalysing the synthesis of caffeine in coffee. *Phytochemistry*, **37** (6), 1577-1584.
- MIDDELHOVEN W.J., BAKKER C.M. (1982) Degradation of caffeine by immobilized cells of *Pseudomonas putida* strain C 3024. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **15**, 214-217.
- MOLINA M.R., DE LA FUENTE G., BATTEN M.A., BRESSANI R. (1974) Decaffeination. A process to detoxify coffee pulp. *J. Agr. Food Chem.*, **22** (6), 1055-1059.
- MOSS M.O., BADII F., CLIFFORD M.N. (1990) Reduced aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* after growth on a caffeine-containing medium. *Lett. Appl. Microbiol.*, **10** (5), 205-207.
- NEGISHI O., OZAWA T., IMAGAWA H. (1985a) Conversion of xanthosine into caffeine in tea plants. *Agr. Biol. Chem.*, **49** (1), 251-253.
- NEGISHI O., OZAWA T., IMAGAWA H. (1985b) Methylation of xanthosine by tea-leaf extracts and caffeine biosynthesis. *Agr. Biol. Chem.*, **49** (3), 887-890.
- NEGISHI O., OZAWA T., IMAGAWA H. (1985c) The role of xanthosine in the biosynthesis of caffeine in coffee plants. *Agr. Biol. Chem.*, **49** (7), 2221-2222.
- NEHLIG A., DEBRY G. (1994) Potential genotoxic, mutagenic and antimutagenic effects of coffee: a review. *Mutat. Res.*, **317** (2), 145-162.
- OMURA T., SATO R. (1964a) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239** (7), 2370-2378.
- OMURA T., SATO R. (1964b) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J. Biol. Chem.*, **239** (7), 2379-2385.

- ONIONS A.H.S., ALLSOPP D., EGGINS H.O.W. (1981) Smith's introduction to industrial mycology. Seventh Edition. Edward Arnold, London.
- ORIOI E., RAIMBAULT M., ROUSSOS S., VINIEGRA-GONZALEZ G. (1988) Water and mater activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 498-503.
- PATEMAN J.A., KINGHORN J.R., DUNN E., FORBES E. (1973) Ammonium regulation in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.*, **114** (3), 943-950.
- PEARSON L.J., MARTH E.H. (1990) Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of methylxanthines: caffeine and theobromine. *J. Food Protect.*, **53** (1), 47-50.
- PERRAUD-GAIME I. (1995) Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France, 210 p.
- PERRAUD-GAIME I., ROUSSOS S. (1995) Selection of filamentous fungi for decaffeination of coffee pulp in solid state fermentation prior to formation of conidiospores. *In* : ROUSSOS S., LONSANE B.K., RAIMBAULT M., VINIEGRA G. (1995) Advances in solid state fermentation. Kluwer Acad. Press. (sous presse) 13 p.
- PETERMANN J.B., BAUMANN T.W. (1983) Metabolic relations between methylxanthines and methyluric acids in *Coffea* L. *Plant Physiol.*, **73**, 961-964.
- PHAN-TAN-LUU R., MATHIEU D. FENEUILLE D. (1983) Méthodologie de la recherche expérimentale. Institut Universitaire de Technologie, Aix-en-Provence, France.
- PITT J.I. (1979) The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic press, London, New-York, Toronto, Sydney, San Francisco.
- PUTRAMENT A., BARANOWSKA H., BILINSKI T., PRAZMO W. (1972) On the specificity of caffeine effects. *Mol. Gen. Genet.*, **118**, 373-379.
- RAIMBAULT M. (1980) Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. Thèse d'Etat, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 291 p.
- RAPER K.B., FENNELL D.I. (1965) The genus *Aspergillus*. Robert E. KRIEGER publishing company, Malabar, Florida.
- ROBERTS J.J. (1984) Mechanism of potentiation by caffeine of genotoxic damage induced by physical and chemical agents: possible relevance to carcinogenesis. 239-253. *In* : DEWS P.B. (1984) Caffeine. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, Tokyo.

- ROBERTS M.F., WALLER G.R. (1979) *N*-methyltransferases and 7-methyl-*N*⁹-nucleoside hydrolase activity in *Coffea arabica* and the biosynthesis of caffeine. *Phytochemistry*, **18** (3), 451-455.
- ROGERS P.J., RICHARDSON N.J. (1993) Why do we like drinks that contain caffeine ?. *Trends Food Sci. Technol.*, **4** (4), 108-111.
- ROLLINS M.J., GAUCHER G.M. (1994) Ammonium repression of antibiotic and intracellular proteinase production in *Penicillium urticae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41** (4), 447-455.
- ROTHFOS B. (1986) Coffee consumption. Gordian-Max Rieck GmbH, Hamburg. p.333-342.
- ROUSSOS S. (1985) Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse d'Etat, Université de Provence, France, 193 p.
- ROUSSOS S., AQUIAHUATL M.A., CASSAIGNE J., FAVELA E., GUTIERREZ M., HANNIBAL L., HEURTA S., NAVA G., RAIMBAULT M., RODRIGUEZ W., SALAS J.A., SANCHEZ R., TREJO M., VINIEGRA-GONZALEZ G. (1989) Detoxificación de la pulpa de café por fermentación sólida. 121-143. In : ROUSSOS R., LICONA FRANCO R., GUTIERREZ ROJAS M. (1989) Memorias del I Sem. Int. sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera, 12-15 de Abril de 1989, Xalapa, Veracruz, Mexique.
- ROUSSOS S., AQUÍAHUATL M.A., TREJO-HERNÁNDEZ M.R., GAIME PERRAUD I., FAVELA E., RAMAKRISHNA M., RAIMBAULT M., VINIEGRA-GONZÁLEZ G. (1995) Biotechnological management of coffee pulp - isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 756-762.
- ROUSSOS S., HANNIBAL L., AQUIAHUATL M.A., TREJO HERNANDEZ M.R., MARAKIS S. (1994) Caffeine degradation by *Penicillium verrucosum* in solid state fermentation of coffee pulp: critical effect of additional inorganic and organic nitrogen sources. *J. Food Sci. Technol.*, **31** (4), 316-319.
- ROUSSOS S., OLMOS A., RAIMBAULT M., SAUCEDO-CASTAÑEDA G., LONSANE B.K. (1991) Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system: conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol. Tech.*, **5** (6), 415-420.
- ROUSSOS S., PERRAUD-GAIME I. (1995) Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. In : GALINDO E., RAMIREZ O. (1995) Memorias del VI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 10-14 de Septiembre de 1995, Ixtapa, Gro., Mexique.

- ROUSSOS S., RAIMBAULT M. (1982) Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. 1. "Screening" des souches cellulolytiques. *Ann. Microbiol. Institut Pasteur*, **133**, 455-464.
- SÁNCHEZ S., PANIAGUA L., MATEOS R.C., LARA F., MORA J. (1981) Nitrogen regulation of penicillin G biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. 147-154. In : VEZINA C., SINGH K. (1981) Advances in biotechnology. Volume 3. Pergamon Press, Canada Ltd.
- SAUER M., KAPPELI O., FIECHTER A. (1982) Comparison of the cytochrome P450-containing monooxygenases originating from two different yeasts. 453-457. In : HIETANEN E., LAITINEN M., HÄNNINEN O. (1982) Cytochrome P-450, biochemistry, biophysics and environmental implications. Volume 23. Elsevier Biomedical Press B.V.
- SCAZZOCCHIO C., DARLINGTON A.J. (1968) The induction and repression of the enzymes of purine breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **166**, 557-568.
- SCHLIENGER J.L., LEVY A. (1989) Caféine, café et santé. *J. Méd. Strasbourg*, **20** (2), 85-87.
- SCHWIMMER S., KURTZMAN R.H. (1972) Fungal decaffeination of roast coffee infusions. *J. Food Sci.*, **37**, 921-924.
- SCHWIMMER S., KURTZMAN R.H., HEFTMANN E. (1971) Caffeine metabolism by *Penicillium roqueforti*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 109-113.
- SERIZAWA N., MATSUOKA T. (1993) The role of cytochrome P-450_{ca} in *Streptomyces*: interaction of azole compounds with cytochrome P-450_{ca}. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57** (10), 1777-1778.
- SMITH A.W. (1985) Introduction. 1-41. In : CLARKE R.J., MACRAE R. (1985) Coffee. Volume 1. Elsevier Applied Science, London, New-York.
- SMITH J.E. (1994) Biotechnology handbooks. Volume 7. Plenum Press, New-York, London.
- SMITH J.E., BERRY D.R. (1975) The Filamentous Fungi. Volume 1. Edward Arnold, London.
- SMITH J.E., BERRY D.R. (1976) The Filamentous Fungi. Volume 2. Edward Arnold, London.
- SMYLY D.S., WOODWARD B.B., CONRAD E.C. (1976) Determination of saccharin, sodium benzoate, and caffeine in beverages by reverse phase high-pressure. *J. AOAC*, **59** (1), 14-19.
- STAVRIC B. (1988a) Methylxanthines: toxicity to humans. 1. Theophylline. *Food Chem. Toxicol.*, **26** (6), 541-565.
- STAVRIC B. (1988b) Methylxanthines: toxicity to humans. 2. Caffeine. *Food Chem. Toxicol.*, **26** (7), 645-662.

- STAVRIC B. (1988c) Methylxanthines: toxicity to humans. 3. Theobromine, paraxanthine and the combined effects of methylxanthines. *Food Chem. Toxicol.*, **26** (8), 725-733.
- STEHMANN C., KAPTEYN J.C., DE WAARD M.A. (1994) Development of a cell-free assay from *Botrytis cinerea* as a biochemical screen for sterol biosynthesis inhibitors. *Pestic. Sci.*, **40**, 1-8.
- STEINHART H., MÖLLER A. (1993) Verwendung des begriffes "natürlich" in zusammenhang mit den coffein-extraktionsmitteln kohlendioxid und ethylacetat bei rohkaffee. *Deut. Lebensm. Rundsch.*, **89** (1), 10-14.
- SUZUKI T., ASHIHARA H., WALLER G.R. (1992) Purine and purine alkaloid metabolism in *Camellia* and *Coffea* Plants. *Phytochemistry*, **31** (8), 2575-2584.
- SUZUKI T., TAKAHASHI E. (1975) Biosynthesis of caffeine by tea-leaf extracts. Enzymic formation of theobromine from 7-methylxanthine and of caffeine from theobromine. *Biochem. J.*, **146**, 87-96.
- SUZUKI T., WALLER G.R. (1984a) Biodegradation of caffeine: formation of theophylline and theobromine from caffeine in mature *Coffea arabica* fruits. *J. Sci. Food Agr.*, **35**, 66-70.
- SUZUKI T., WALLER G.R. (1984b) Biosynthesis and biodegradation of caffeine, theobromine, and theophylline in *Coffea arabica* L. fruits. *J. Agr. Food Chem.*, **32**, 845-848.
- SUZUKI T., WALLER G.R. (1985) Purine alkaloids of the fruits of *Camellia sinensis* L. and *Coffea arabica* L. during fruit development. *Ann. Bot.*, **56**, 537-542.
- SUZUKI T., WALLER G.R. (1988) Metabolism and analysis of caffeine and other methylxanthines in coffee, tea, cola, guarana and cacao. 184-220. In : LINSKENS H.F., JACKSON J.F. (1988) Modern methods of plant analysis. New series, Volume 8. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris, Tokyo.
- TANAKA E., ISHIKAWA A., MISAWA S. (1992) Simplified test for determination of drug-oxidizing capacity in rats with chemical-induced liver injury using caffeine and trimethadione as model drugs. *Pharmacol. Toxicol.*, **70** (3), 177-180.
- TANIMURA S. (1994) Determination of caffeine and isohumulones in saliva by HPLC analysis. *J. Agr. Food Chem.*, **42** (8), 1629-1631.
- THOMAS B.R., FANG X.G., SHEN P., GHODBANE S. (1994) Mixed ion pair liquid chromatography method for the simultaneous assay of ascorbic acid, caffeine, chlorpheniramine maleate, dextromethorphan HBr monohydrate and paracetamol in Frenadol™ sachets. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **12** (1), 85-90.

- TSUBOUCHI H., TERADA H., YAMAMOTO K., HISADA K., SAKABE Y.** (1985) Caffeine degradation and increased ochratoxin A production by toxigenic strains of *Aspergillus ochraceus* isolated from green coffee beans. *Mycopathologia*, **90**, 181-186.
- TURNER J.E., ALLISON N.** (1995) Degradation of methoxylated aromatic acids by *Pseudomonas putida*. *J. Appl. Bacteriol.*, **78** (2), 125-133.
- VERGNES M.F., GROSSET C., ALARY J.** (1988) Etude par chromatographie liquide haute performance des métabolites potentiels de la caféine. Comparaison de différentes techniques. *J. Chromatogr.*, **455**, 369-375.
- WAKABAYASHI K., HIZUE M., NOZAKI H., NAKAYAMA M., KURIHARA N.** (1994) Enantiotopic selectivity in monodemethylation of fenitrothion by rat liver glutathione *S*-transferase isoenzymes and mouse liver cytosol. *J. Pestic. Sci.*, **19** (4), 277-284.
- WALLER G.R., ANAYA-LANG A.L., SAGRERO-NIEVES L., CELIS OCHOA CORDERO A.B., KUMARI D., FRIEDMAN J., FRIEDMAN N., CHOU C.-H.** (1989) A problem in coffee plantations: autotoxicity of caffeine and other compounds. 363-371. ASIC, 13e Coll. Sci. Int. sur le Café, 21-25 Août, Paipa, Colombie.
- WALLER G.R., ASHIHARA H., SUZUKI T.** (1993) Updated review of purine and purine alkaloid metabolism in *Coffea* and *Camellia* plants. 141-154. ASIC, 15e Coll. Sci. Int. sur le Café, 06-11 Juin 1993, Montpellier, France.
- WALLER G.R., MAC VEAN C.D., SUZUKI T.** (1983) High production of caffeine and related enzyme activities in callus cultures of *Coffea arabica* L. *Plant Cell Rep.*, **2**, 109-112.
- WALLER G.R., SUZUKI T., ROBERTS M.F.** (1980) Cell-free metabolism of caffeine in *Coffea arabica*. 627-635. ASIC, 9e Coll. Sci. Int. sur le Café, 16-20 Juin 1980, Londres, Angleterre.
- WINDHOLZ M., BUDAVARI S.** (1983) The Merck index. 20th Edition. Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey.
- WOOLFOLK C.A.** (1975) Metabolism of *N*-methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on caffeine as the sole source of carbon and nitrogen. *J. Bacteriol.*, **123** (3), 1088-1106.
- ZULUAGA J.** (1989) Utilización integral de los subproductos del café. 63-76. In : ROUSSOS R., LICONA FRANCO R., GUTIERREZ ROJAS M. (1989) Memorias del I Sem. Int. sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera, 12-15 de Abril de 1989, Xalapa, Veracruz, Mexique.

ANNEXES

ANNEXE 1

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

Milieu CMS (Café Moulu-Saccharose) :

Café moulu (Grand Mère "Familial")	40	g.l ⁻¹
Saccharose	2	
KH ₂ PO ₄	1,30	
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	0,12	
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,30	
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,30	
Agar	20	
pH final	5,6	

Stérilisation 15 min - 121 °C

Préparation du milieu avant stérilisation :

A 40 g de café moulu, ajouter 1000 ml d'eau distillée

Porter à ébullition

Filtrer (élimination du marc)

Ajouter au filtrat les sels et le sucre. Dissoudre ; ajuster le volume

Ajuster le pH (HCl ou NaOH)

Ajouter l'agar

Milieu Malt Extract Agar (MEA) : (PITT, 1979)

Extrait de malt (MERCK)	20	g.l ⁻¹
Bacto Peptone	1	
Glucose	20	
Agar	15	

Stérilisation 15 min - 121 °C

Milieu Potato Dextrose Agar (PDA) - Milieu déshydraté prêt à l'emploi (DIFCO) :

Infusion de 200 g.l ⁻¹ de pommes de terre		
Bacto Dextrose	20	g.l ⁻¹
Bacto Agar	15	
pH final	5,6	

Stérilisation 15 min - 121 °C

Milieu Czapek-Dox (CD) - Milieu déshydraté prêt à l'emploi (DIFCO) :

Saccharose	30 g.l ⁻¹
NaNO ₃	3
KH ₂ PO ₄	1
KCl	0,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01
Agar	15
pH final	6,0 - 6,5

Stérilisation 20 min - 121 °C

Milieu Czapek Yeast Agar (CYA) : (PITT, 1979)

Extrait de levure (MERCK)	5 g.l ⁻¹
Saccharose	30
NaNO ₃	3
KH ₂ PO ₄	1
KCl	0,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01
Agar	15

Stérilisation 15 min - 121 °C

ANNEXE 2a

CLES DICHOTOMIQUES D'IDENTIFICATION DES *Aspergillus*

(RAPER et FENNELL, 1965)

132

KEYS AND SPECIES DESCRIPTIONS

Synonymy

Many specific and varietal names are here reduced to synonymy. If the type culture or an accepted representative was available for this study and proved to be identical with a previously known species, the name is designated as a *synonym*. If, on the other hand, such material proved to be very closely related to an earlier species but differed from it in some minor character or characters, it is discussed as a *probable synonym*. If no material representative of a species was available but the original description provided adequate information to indicate possible identity with some known species, the name is listed as a *possible synonym*. In some cases where descriptions provided less information, but were sufficient to indicate group relationship, the name is listed as a *group synonym*. Certain other species, inadequately described and represented by neither dried material nor living cultures, are simply listed in the Species Index as unidentifiable.

KEYS

No general or comprehensive key to the species of the genus *Aspergillus* is presented. To identify an *Aspergillus*, its group relationship should first be determined by means of the keys presented below, and assignment to species should be made by means of the comparatively simple key that precedes the descriptions of species included in that group. Unfortunately, cases will arise where uncertainty exists regarding the correct group relationship, thus necessitating consideration of the species keys in two or more groups to establish species identity. We have attempted to cross-key those species which show definite affinities for more than one group.

Two contrasting keys to the groups of *Aspergilli* follow. The first of these presents the 18 groups in the order of their appearance in the text and is in substantial part a summary of the salient characteristics of the different groups. Primary emphasis is based upon the number of series of sterigmata—whether uniseriate, biseriate and uniseriate, or strictly biseriate. Secondary separations are made upon the form of the conidial heads and their pigmentation. Further separations hinge upon the presence or absence of cleistothecia, hülle cells, and sclerotia, upon the form and dimensions of vesicles, and upon the character and pigmentation of conidiophore walls. The second key is more artificial in construction and is based primarily upon the color of the conidial heads, which is generally the most obvious character when a culture is first observed; details of morphology are included as supplementary criteria.

KEY TO GROUPS

Based Primarily on Morphology

I. Sterigmata strictly uniseriate

A. Conidial heads clavate with spore masses splitting at

- maturity, in blue-green shades; vesicles strongly clavate.....*A. clavatus* group
- B. Conidial heads radiate to columnar, variable in color; vesicles variable, from globose or nearly so to subclavate or turbinate
1. Conidial heads radiate, variable in size, in bluish green or olive green shades (brown in one species); osmophilic; bright yellow cleistothecia abundant in most species.....*A. glaucus* group
 2. Conidial heads radiate to very loosely columnar, comparatively large, in grayish or yellowish green to olive-brown shades; white to purplish or olive cleistothecia produced in three species.....*A. ornatus* group
 3. Conidial heads radiate (short columnar in one species), small, in pinkish fawn shades; cleistothecia lacking.....*A. cervinus* group
 4. Conidial heads loosely to definitely columnar, often long, thin and twisted, in green shades; conidia cylindrical when young; osmophilic; cleistothecia lacking.....*A. restrictus* group
 5. Conidial heads compactly columnar, in pale gray-green to dark blue-green shades; conidia not cylindrical when young; not osmophilic.....*A. fumigatus* group
 - a. Cleistothecia lacking.....*A. fumigatus* series
 - b. Cleistothecia present, white to yellowish.....*A. fischeri* series
- II. Sterigmata biseriata or uniseriata (the former predominant), or with both conditions in the same head
- A. Conidial heads usually globose when young, radiate or splitting in age, rarely loosely columnar; vesicles globose to subglobose or somewhat elongate; conidiophores not constricted below the vesicle; sclerotia produced in many species
1. Conidial heads globose when young, sometimes remaining so but usually splitting into more or less well-defined columns at maturity
 - a. Conidial heads in yellow, buff, or ochraceous shades; conidiophores commonly roughened and often pigmented; cleistothecia in one species.....*A. ochraceus* group
 - b. Conidial heads in shades of black; conidiophores usually smooth and colorless or becoming pigmented below the vesicle.....*A. niger* group
 - c. Conidial heads white or cream colored; conidiophores smooth and colorless.....*A. candidus* group
 2. Conidial heads typically radiate with spore chains usually separate, sometimes forming poorly defined columns
 - a. Conidial heads in yellow-green to deep olive-brown shades; conidiophores usually roughened, colorless.....*A. flavus* group
 - b. Conidial heads in yellow-brown to dull buff

- shades; conidiophores smooth or delicately roughened, colorless or lightly pigmented *A. wentii* group
- B. Conidial heads large, radiate; vesicles strictly globose; conidiophores definitely constricted below the vesicles; sclerotia lacking
- Conidial heads of one type, buff-brown, pale yellow-green, or blue-green; conidiophores usually colorless, smooth; osmophilic; cleistothecia produced in two species *A. cremeus* group
 - Conidial structures of two types; large heads light gray, green, or olive-buff with conidiophores usually in brown shades and encrusted; fragmentary structures borne near or beneath the agar surface *A. sparsus* group
- III. Sterigmata strictly biseriate
- A. Conidial heads typically in definite green shades; hülle cells usually globose but sometimes irregularly ovate to pyriform
- Conidial heads typically radiate, becoming loosely columnar in some species; conidiophores colorless or light brown, commonly exceeding 300 μ in length; vesicles variable, elongate, subglobose, hemispherical, or only slightly expanded; hülle cells sometimes abundant, more often limited or lacking *A. versicolor* group
 - Conidial heads uniformly pigmented, small or fragmentary structures sometimes present; hyphal masses or sclerotia occasionally produced *A. versicolor* series
 - Conidial heads not uniformly pigmented, both white and green heads present (at least on some substrates) *A. janus* series
 - Conidial heads typically columnar, usually dark yellow-green but occasionally gray blue-green or brownish; conidiophores brown walled, commonly less than 300 μ long; vesicles subglobose, hemispherical, or terminally flattened; hülle cells typically produced, usually abundant, clustered, forming crusts, or enveloping ascocarps; cleistothecia common, purplish at maturity; ascospores in orange-red to blue-violet shades *A. nidulans* group
- B. Conidial heads in shades other than true green; hülle cells, when present, elongate to strongly curved and twisted
- Conidial heads radiate to broadly columnar, in drab, olive, or dull brown shades; conidiophores typically brown-walled; vesicles variable from globose to elongate or hemispherical; hülle cells elongate, often strongly curved or twisted *A. ustus* group
 - Conidial heads broadly to irregularly columnar, white to avellaneous or vinaceous; conidiophores with walls brown or uncolored; vesicles subglucose to elongate; elongate hülle cells or heavy-walled hyphal elements present *A. flavipes* group

3. Conidial heads compactly columnar, typically in cinnamon to orange-brown or pale buff shades; conidiophores colorless; vesicles hemispherical..... *A. terreus* group

KEY TO GROUPS

Based Primarily on Color

- A. Conidial heads showing some shade of green during development..... B.
 AA. Conidial heads in some other color..... L.
- B. Vesicles clavate or subclavate; sterigmata uniseriate... C.
 BB. Vesicles not clavate; sterigmata uniseriate or biseriate.. D.
- C. Vesicles strongly clavate; conidial heads blue-green, becoming gray in age..... *A. clavatus* group
 CC. Vesicles subclavate; sterigmata uniseriate; conidial heads yellow-green, gray-green, or blue-green when young, darkening in most species..... *A. ornatus* group
- D. Conidial heads bright yellow-green when young, sometimes becoming brown in age, loosely radiate; sterigmata biseriate in most species..... *A. flavus* group
 DD. Conidial heads in other green shades; sterigmata uniseriate or biseriate..... E.
- E. Colonies mostly showing naked yellow cleistothecia and yellow or red encrusted hyphae..... *A. glaucus* group
 EE. Colonies lacking naked yellow cleistothecia and yellow and red encrusted hyphae..... F.
- F. Conidial heads definitely columnar..... G.
 FF. Conidial heads globose, radiate, or loosely columnar.... I.
- G. Sterigmata uniseriate..... H.
 GG. Sterigmata biseriate; globose to subglobose hülle cells common; cleistothecia in some species; ascospores orange-red to violet..... *A. nidulans* group
- H. Conidial heads columnar, long, narrow (often twisted) to irregular; conidia usually formed as cylindrical segments from the sterigmata; cleistothecia lacking; typically osmophilic..... *A. restrictus* group
 HH. Conidial heads columnar, compact and typically uniform in diameter throughout; conidia not formed as cylindrical segments; cleistothecia in some species; not typically osmophilic..... *A. fumigatus* group
- I. Vesicles small, variable in shape..... J.
 II. Vesicles large, strictly globose; conidiophores constricted below the vesicle..... K.

- J. Conidial heads blue-green, dull yellow-green, or gray blue-green, radiate to loosely columnar; hülle cells globose to subglobose..... *A. versicolor* group
- JJ. Conidial heads olive, olive-gray, drab, to light brown; radiate to broadly columnar; hülle cells elongate to twisted..... *A. ustus* group
- K. Conidial heads graying in age from blue-green or olive-buff shades..... *A. sparsus* group
- KK. Conidial heads pale yellow-green, blue-green, or buff-brown..... *A. cremeus* group
(see also *A. wentii* group)
- L. Growth very sparse and sporulation poor on Czapek's agar..... *A. cerinus* group
- LL. Growth and sporulation usually abundant on Czapek's agar..... M.
- M. Heads loosely to compactly columnar..... N.
- MM. Heads globose to radiate..... O.
- N. Heads loosely columnar, white, flesh colored, or cream-buff..... *A. flavipes* group
- NN. Heads compactly columnar, avellaneous to cinnamon..... *A. terreus* group
- O. Heads persistently white; larger heads definitely globose or radiate..... *A. candidus* group
- OO. Heads not white..... P.
- P. Heads in yellow, ochraceous or light brownish shades... Q.
- PP. Heads in black or dark brown shades..... *A. niger* group
- Q. Heads in sulphur yellow to ochraceous shades..... *A. ochraceus* group
- QQ. Heads in yellow-brown to dull buff shades..... *A. wentii* group
(also *A. cremeus* group in part)

GROUP KEY

- I. Conidial heads in pale to intense yellow or yellow-green shades when young
- A. Colonies not shifting to brown on Czapek's agar; conidia definitely echinulate
1. Sterigmata either single or double with the latter predominant; heads radiate or very loosely columnar *A. flavus* Link
 2. Sterigmata typically in a single series
 - a. Heads columnar; sterigmata usually uniseriate... *A. flavus* var. *columnaris*, n. var.
 - b. Heads radiate; sterigmata uniseriate *A. parasiticus* Speare
- B. Colonies shifting to light brownish green in age on Czapek's agar; conidia irregularly roughened or smooth
1. Conidia large, mostly 4.5 to 7.0 μ but up to 8.0 μ or 10.0 μ , elliptical at first, then globose to subglobose, smooth to irregularly roughened
 - a. Conidiophores borne primarily from the substrate *A. oryzae* (Ahlb.) Cohn
 - b. Conidiophores borne primarily as short branches from aerial hyphae *A. oryzae* (Ahlb.) Cohn var. *effusus* (Tiraboschi) Ohara
 2. Conidia small, oval to elliptical, mostly 3.0 to 3.5 μ by 2.4 to 3.0 μ , smooth or nearly so
 - a. Growth negligible on Czapek's agar; conidial structures abundant, zonately arranged on malt agar; conidiophores smooth or nearly so *A. zonatus* Kwon & Fennell, n. sp.
 - b. Growth spreading on both Czapek's and malt agars; conidial structures often forming coremi-form clusters; conidiophores conspicuously roughened *A. clavato-flavus*, n. sp.
- II. Conidial heads in deep yellow-green to olive-brown shades when young; conidia conspicuously verruculose
- A. Conidial heads at first deep yellow-green, shifting to brownish green or brown on Czapek's agar *A. tamarii* Kita
- B. Conidial heads quickly olive-brown then dark brown.. *A. flavo-furcatis* Batista & Maia
- III. Conidial heads in pale yellowish olive or grayish olive shades; conidia smooth or nearly so
- A. Conidiophores conspicuously echinulate *A. subolivaceus*, n. sp.
- B. Conidiophores smooth or nearly so *A. avenaceus* Smith

ANNEXE 2b

CLES DICHOTOMIQUES D'IDENTIFICATION DES *Penicillium*

(PITT, 1979)

320

THE GENUS *PENICILLIUM*

The overwhelming majority of isolates classifiable in subgen. *Penicillium* characteristically produce regularly terverticillate penicilli with one or two rami and spheroidal to ellipsoidal conidia. All are assigned here to sect. *Penicillium*.

In the key which follows, the species with unusual characteristics have been keyed first for convenience. For isolates which fit the brief description given in the preceding paragraph, the key may be entered at couplet 8.

III. Analytical Key to Subgen. *Penicillium*

1. Conidia borne as cylinders, with at least a proportion remaining so at maturity Sect. *Cylindrosporum*, Ser. *Italica* . . . 5
Conidia borne as ellipsoids or spheroids and remaining so at maturity 2
- 2 (1b). Colonies on G25N not exceeding 10 mm diam; conidia *en masse* brown; penicilli often irregular Sect. *Inordinate*, Ser. *Arenicola*, *P. arenicola* (111)
Colonies on G25N exceeding 10 mm diam; conidia *en masse* green or olive; penicilli characteristically in regular verticils 3
- 3 (2b). Stipes commonly exceeding 1 mm long; penicilli often with 3 or more appressed rami Sect. *Coronatum*, Ser. *Olsonii*, *P. olsonii* (110)
Stipes not exceeding 1 mm long; penicilli with no more than two rami . . . 4
- 4 (3b). At most one ramus, borne subterminally; penicilli often biverticillate Spp. from Subgen. *Furcatum* . . . Chap. 9
One to two rami characteristically produced, borne terminally Sect. *Penicillium* . . . 8
- Sect. *CYLINDROSPORUM*, Ser. *Italica* (spp. 106-109)
 - 5 (1a). Conidia *en masse* olive *P. digitatum* (107)
Conidia *en masse* green 6
 - 6 (5b). Colonies on CYA at 25°C exceeding 50 mm diam *P. resticulosum* (108)
Colonies on CYA at 25°C not exceeding 50 mm diam 7
 - 7 (6b). Mycelium salmon; conidial walls spinulose *P. fennelliae* (109)
Mycelium white; conidia smooth walled *P. italicum* (106)
- Sect. *PENICILLIUM*
 - 8 (4b). Colonies floccose; conidia *en masse* persistently white or pale grey green; isolated from cheese or cheese factory Ser. *Camembertii*, *P. camembertii* (99)
Colonies with surface texture velutinous or fasciculate, conidia *en masse* blue, green, grey or rarely olive; source inconsequential 9
 - 9 (8b). Colonies on CYA at 25°C not exceeding 30 mm diam Ser. *Urticicola* . . . 20

- Colonies on CYA at 25°C exceeding 30 mm diam 10
- 10 (9b). Stipes smooth walled Ser. *Expansa* . 11
 Stipes commonly rough walled Ser. *Viridicata* . 15
- Ser. *Expansa* (spp. 90–92)
- 11 (10a). Conidia *en masse* blue or blue green; on CYA at 25°C, exudate, soluble pigment and/or reverse colouration yellow; sometimes growth at 37°C 12
 Conidia *en masse* green; on CYA at 25°C, exudate, soluble pigment and reverse colouration not yellow; no growth at 37°C 13
- 12 (11a). Colonies velutinous to lightly floccose; conidiogenesis moderate to heavy; penicilli predominantly terverticillate *P. chrysogenum* (91)
 Colonies floccose; conidiogenesis sparse; penicilli commonly biverticillate *P. griseoroseum* (66)
- 13 (11b). On CYA at 25°C, exudate, soluble pigment and reverse colouration red; conidia *en masse* dark green *P. atramentosum* (92)
 On CYA at 25°C, exudate, soluble pigment and reverse colouration orange or brown; conidia *en masse* grey green 14
- 14 (13b). Exudate on CYA at 25°C near maroon; mycelium on MEA often deep yellow; penicilli sometimes quaterverticillate *P. hirsutum* (96)
 Exudate on CYA at 25°C orange brown; mycelium on MEA white or inconspicuous; penicilli not quaterverticillate *P. expansum* (90)
- Ser. *Viridicata* (spp. 93–97)
- 15 (10b). Conidia *en masse* greyish blue *P. aurantiogriseum* (98)
 Conidia *en masse* green or greyish green 16
- 16 (15b). Conidial walls rugose or spinose *P. echinulatum* (97)
 Conidia smooth walled 17
- 17 (16b). Colonies on CYA and MEA at 25°C exceeding 40 mm diam; reverse commonly deep green *P. roquesfortii* (95)
 Colonies on CYA and MEA at 25°C not exceeding 40 mm diam; reverse pale or brown 18
- 18 (17b). Exudate on CYA at 25°C orange or brown; mycelium on MEA white or inconspicuous; penicilli terverticillate; conidia smooth walled 19
 Exudate on CYA at 25°C near maroon; mycelium on MEA often deep yellow; penicilli sometimes quaterverticillate and conidia sometimes rugose *P. hirsutum* (96)
- 19 (18a). Colonies on CYA and MEA at 25°C exceeding 35 mm and 30 mm diam respectively; conidia *en masse* dull green; colonies on MEA often producing masses of detached conidia when jarred *P. crustosum* (94)
 Colonies on CYA and MEA at 25°C not exceeding 35 and 30 mm diam respectively; conidia *en masse* usually bright yellow green; conidia on MEA adhering to the colonies *P. viridicatum* (93)
- Ser. *Urticicola* (spp. 100–105)
- 20 (9a). Conidia *en masse* olive *P. olivicolor* (102)
 Conidia *en masse* green, blue or grey 21

- 21 (20b). Phialides commonly 4.5–6 μ m long *P. griseofulvum* (100)
 Phialides exceeding 6 μ m long 22
- 22 (21b). Stipe walls smooth to finely roughened 23
 Stipe walls commonly rugose 25
- 23 (22a). Penicilli broad, often 40 mm or more across due to numerous apically
 enlarged metulae *P. brevicompactum* (103)
 Penicilli narrow, commonly 30 mm or less across with metulae cylindroidal
 24
- 24 (23b). Colonies low, dense and velutinous; exudate clear, soluble pigment
 absent *P. puberulum* (101)
 Colonies deep, floccose, fasciculate or minutely coremial; exudate and soluble
 pigment orange brown *P. expansum* (90)
- 25 (22b). Colonies on CYA and MEA at 25°C exceeding 28 mm and 25 mm
 diam respectively *P. viridicatum* (93)
 Colonies on CYA and MEA at 25°C not exceeding 28 mm and 25 mm diam
 respectively 26
- 26 (25b). On CYA at 25°C, colony texture velutinous to fasciculate, mycelium
 white, soluble pigment absent; conidia usually spheroidal
 *P. verrucosum* (105)
 On CYA at 25°C, colony texture fasciculate to coremial, mycelium white to
 yellow, yellow to brown soluble pigment typically produced; conidia ellip-
 soidal to subspheroidal *P. granulatum* (104)

IV. Section *Penicillium*

Subsect. *Fasciculata* Raper & Thom, Man. *Penicillia*: 467, 1949 (nom. inval., Art. 36).
 Subsect. *Lanata* Raper and Thom, op. cit.: 419, 1949 (nom. inval., Art. 36).
 Subsect. *Velutina* Raper & Thom pro parte, op. cit.: 336, 1949 (nom. inval., Art. 36).
 Subsect. *Funiculosa* Raper & Thom pro parte, op. cit.: 445, 1949 (nom. inval., Art. 36).

Conidiophores borne singly or aggregated into fascicles or rudimentary coremia, characteristically bearing regular, terminal, appressed, terverticillate penicilli, although biverticillate and quaterverticillate penicilli also produced by some species; phialides ampulliform. Growth on G25N medium rapid, colonies usually exceeding 18 mm diam in 7 days. Growth at 37°C absent (weakly positive sometimes for one species); at 5°C at least germination occurring, more commonly macroscopic colonies present in 7 days.

Typc species: *Penicillium expansum* Link ex Gray.

The sixteen species assembled in sect. *Penicillium* all possess similar types of penicillus and show similar responses to growth on G25N medium and at 5°C and 37°C. Such similarities indicate that the species share a recent common ancestry.

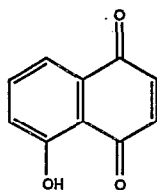
ANNEXE 3

SCHEMAS DES INHIBITEURS DE CYTOCHROMES P-450 ET DE L'ACIDE URIQUE

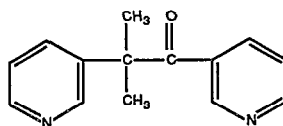
IMIDAZOLE



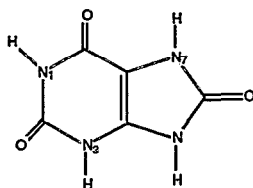
JUGLONE



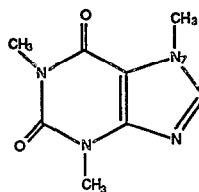
METYRAPONE



ACIDE URIQUE

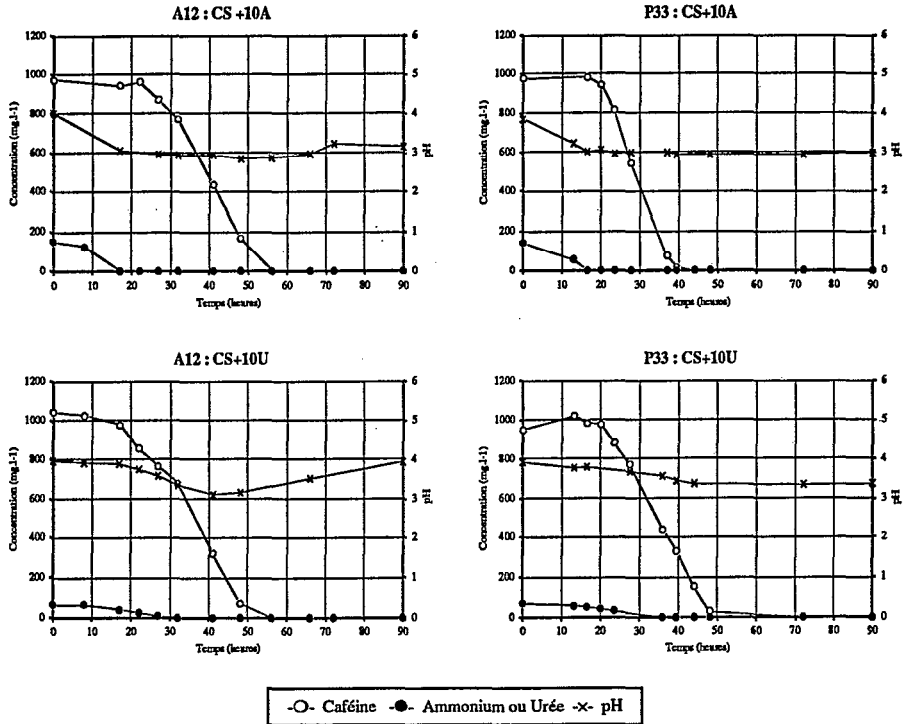


CAFEINE



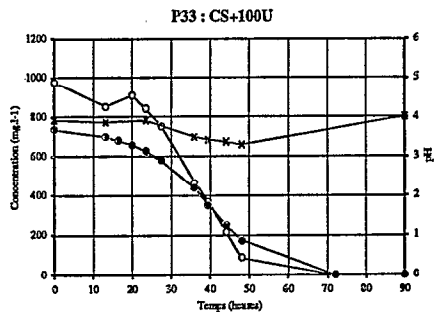
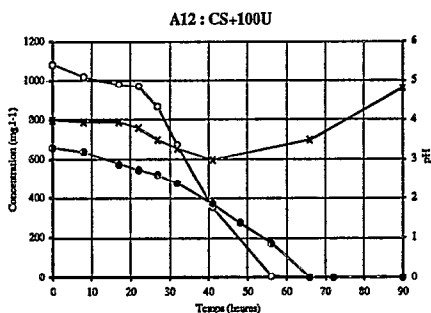
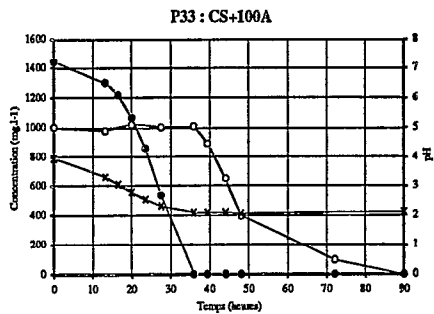
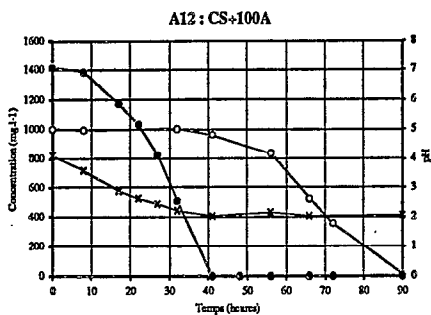
ANNEXE 4

COMPLEMENTS DE LA FIGURE 8.6



Cultures d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 en milieux Caféine-Saccharose, supplémentés en sulfate d'ammonium à 0,136 g.l⁻¹, ou en urée à 0,062 g.l⁻¹.

Evolution du pH et comparaison des cinétiques de consommation de la caféine et de la source simple d'azote.



○- Caffeine ●- Ammonium ou Urée -x- pH

Cultures d'*Aspergillus* V12A25 et de *Penicillium* V33A25 en milieux Caffeine-Saccharose, supplémentés en sulfate d'ammonium à 1,36 g.l⁻¹, ou en urée à 0,62 g.l⁻¹.
Evolution du pH et comparaison des cinétiques de consommation de la caféine et de la source simple d'azote.